

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA**

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO E DA
ALCALINIDADE NA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO
DE *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) EM
DIFERENTES SALINIDADES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR.

Kassio Rios da Silva

Orientador: Wilson Wasielesky Jr.

Rio Grande/RS

Fevereiro de 2014

“Renunciar a própria individualidade equivale a aniquilar a si próprio. A escravidão intelectual é sinônimo da morte intelectual e cada homem que renunciou a própria liberdade intelectual não é outra coisa que o caixão vivente de um espírito falecido.”

Robert G. Ingersoll

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais por me colocarem no mundo e gastarem uma enorme quantidade de energia na minha formação moral e intelectual. Agradeço também ao meu irmão caçula pelo apoio na reta final do meu doutorado e pelos anos de companhia e amizade. A minha companheira Francielle pela compreensão e apoio durante a finalização desta tese.

A todos os bons professores que tive durante nos tempos de escola, desde a professora Hilda ao professor Poty – que gastava horas ensinando a preparar soluções – que no final das contas me ajudaram muito nos trabalhos de laboratório.

A todos os orientadores que me ajudaram durante minha vida acadêmica, Maurício Camargo, Paulo Abreu e Wilson Wasielesky (Mano). Cada um a sua maneira contribuíram para meu amadurecimento pessoal e profissional. Agradeço especialmente ao Mano pelo empurrãozinho no final do doutorado, veio na hora certa!

Aos colegas de curso e de labuta pelas discussões e pela ajuda no planejamento e realização dos experimentos. Agradecimento especial ao Plínio pela ajuda e sugestões em dois experimentos desta tese.

Ao curso de pós-graduação em Oceanografia Biológica, a Universidade Federal do Rio Grande e a CAPES pela oportunidade de realização do doutorado.

Índice

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
Alcalinidade.....	7
Cultivo em baixa salinidade	7
CAPITULO I Efeito da Salinidade e da Alcalinidade no Crescimento e Sobrevivência de <i>Litopenaeus vannamei</i> Cultivado em Sistema de Bioflocos.....	10
CAPITULO II Efeito da Adição de Cálcio no Crescimento e Sobrevivência do Camarão Branco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) em Baixa Salinidade.....	29
CAPITULO III Efeito da concentração de cálcio e da salinidade na respiração, excreção de nitrogênio amoniacal e na atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase em juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i>	45
CONCLUSÕES GERAIS.....	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1.	68
Artigo submetido a revista Journal of the World Aquaculture Society.	68
ANEXO 2.	82
Artigo submetido a revista: Journal of Experimental Biology and Ecology.....	82
ANEXO 3.	97
Artigo submetido a Journal of Experimental Zoology part A.....	97

RESUMO

O cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos (BFT) é realizado com pouco ou nenhuma renovação de água, forte aeração, alimentação balanceada, redução nos níveis de proteína marinha e estímulo à produtividade natural nos meios de criação. O custo mais elevado das terras em regiões costeiras e a legislação ambiental limitam a expansão da aquicultura e o cultivo em locais afastados da costa pode ser uma solução para este problema. Estudos recentes têm focado no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas e em águas artificiais obtidas através da mistura de sais. Entretanto, pouco se sabe a respeito da alcalinidade ideal para o cultivo de *L. vannamei* em BFT e sobre o efeito da suplementação de cálcio no desempenho e sobrevivência da espécie. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo verificar a influência da adição de sais de cálcio e de diferentes níveis de alcalinidade no crescimento e sobrevivência dessa espécie em diferentes salinidades. Foram realizados três experimentos: 1. Efeito da salinidade e da alcalinidade no crescimento e sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos; 2. Efeito da adição de cálcio no crescimento e sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* em baixa salinidade; 3. Efeito da concentração de cálcio e da salinidade na respiração, excreção de nitrogênio amoniacal e na atividade da Na^+/K^+ ATPase em juvenis de *L. vannamei*. Com os resultados obtidos neste estudo podemos chegar as seguintes conclusões: 1. O cultivo em salinidade 12 ou acima é mais seguro frente a possíveis picos de amônia e nitrito no sistema, alcalinidades menores podem ser adotadas em sistemas BFT uma vez que as variações diurnas nos valores de pH são menores se comparados a sistemas convencionais, ademais, menores valores de pH conferem mais segurança ao cultivo uma vez diminuem a concentração do gás amônia (tóxico); 2. A adição de cálcio melhora o crescimento dos

camarões cultivados em salinidade iguais ou superiores a 4. Recomenda-se a adição de cálcio em águas de salinidade 2 e 4 com concentrações de cálcio iguais ou inferiores a 118 mg/L; 3 A adição de cálcio no meio experimental diminui a excreção de amônia e a respiração de *L. vannamei* na salinidade 2, indicando que a adição de cálcio pode diminuir o gasto energético com a osmorregulação podendo propiciar maior energia para outros fins como o crescimento.

ABSTRACT

The objective of this thesis was produce information to low salinity cultivation of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in low salinity waters. The thesis was divided in three main chapters: the chapter one verifies the effects of different alkalinities and salinities in growth and survival of *L. vannamei* during nursery and grow out phase. The second chapter evaluates the effect of different waterborne calcium concentration on survival and growth of *L. vannamei* and the third chapter evaluates the effect of calcium and salinity in shrimp Na^+/K^+ ATPase activity, nitrogen excretion and respiration. Based on data presented in the following chapters, we can conclude that at salinities 12 and above alkalinity had just a minor effect in shrimp performance. It is safer to produce shrimp in salinity 12 and 24 than in salinity two due to fast ammonia and nitrite build up that may occur in BFT system. When using low salinity water its necessary to utilize some strategy to avoid ammonia and nitrite build up. Ammonia can be easily mobilized adding a carbon source, but nitrite might demand more complicated strategies such as inoculation of a mature biofloc, artificial substrates or water renewal. Higher calcium concentration enhance shrimp growth in low salinity (4ppt and below) and calcium supplementation may be a good choice for low salinity shrimp culture when calcium concentration are under 118 mg/L. In chapter tree we found that calcium addition reduced TAN excretion and oxygen consumption at salinity 2 ppt. These findings suggest that higher calcium concentration might be beneficial to *L. vannamei* living in low salinity waters and high alkalinity concentration may be counterproductive in low salinity as ammonia toxicity increases with pH and decreases with salinity.

INTRODUÇÃO GERAL

A maioria dos ecossistemas costeiros está sujeita a mudanças ambientais decorrentes do excesso de nutrientes provenientes de atividade antrópica (Nixon *et al.* 1996, Fisher *et al.* 2006, Lacerda 2006). A diminuição da biodiversidade e estrutura da teia trófica, o florescimento de algas tóxicas e aumento na demanda bioquímica por oxigênio são alguns exemplos dos efeitos deletérios destas mudanças (Bricker *et al.* 2003). Esses problemas são resultantes de uma complexa cadeia de eventos que variam no espaço e no tempo, mas que podem ser atribuídos, em primeira instância, ao aporte excessivo de nitrogênio (N) e fósforo (P) nos estuários e ao processo de eutrofização (Tappin 2002).

Nixon (1995) define eutrofização como o aumento na taxa de produção ou fornecimento de carbono orgânico em determinado ecossistema. Este pode ser produzido no local através da fixação por organismos autotróficos ou ser de origem alóctone. O processo tem origem natural ou antrópica (eutrofização cultural) e está geralmente associado ao aumento no fluxo de nutrientes, sobretudo N e P. As principais causas naturais são: lixiviação e erosão dos solos, ressurgência, aumento na transparência da água, aumento na taxa de herbívora, diminuição no tempo de residência da água no estuário, etc. Dentre as principais causas da eutrofização cultural temos: mudança e intensificação no uso dos solos, aporte de efluentes ricos em N e P e atividades econômicas nas quais são utilizados fertilizantes.

Historicamente, os cultivos intensivos de camarões se utilizaram de alta taxa de renovação de água para garantir a qualidade do meio de cultivo, liberando, via efluentes, cargas significativas de nutrientes e matéria orgânica (Boyd & Clay 1998, Lacerda *et al.* 2006). Os efluentes provenientes de cultivos podem contribuir para a eutrofização dos estuários de duas maneiras: 1) pela adição de matéria orgânica e/ou 2) pelo estímulo à

produção de matéria orgânica pela adição de nutrientes inorgânicos dissolvidos como N e P (Thoman *et al.* 2001).

A eutrofização de ambientes aquáticos por efluentes de cultivo, a introdução de espécies exóticas, a utilização de proteína de origem marinha na formulação de rações e a destruição de habitats costeiros são apontados como os maiores impactos negativos produzidos pela aquicultura (Lightner 1999, Naylor *et al.* 2000, Avnimelech 2006, Lacerda *et al.* 2006, Sena *et al.* 2006, FAO 2009). Outro problema associado à atividade é a incidência de doenças que diminuem a produção dos organismos cultivados e contaminam os organismos selvagens (Schwab & Lehmann 2003). As enfermidades estão principalmente associadas à baixa qualidade da água em cultivos intensivos e à captação da água proveniente de locais onde outros produtores liberaram seus efluentes (Kautsky *et al.* 2000).

Atualmente, as gestões de áreas protegidas tendem a admitir a coexistência de atividades econômicas e a conservação da biodiversidade (Brockington *et al.* 2006, Wilkie *et al.* 2006). Desta maneira, torna-se essencial a redução dos impactos produzidos pelo cultivo de camarões marinhos. Para que isto seja possível torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias limpas que aumentem a produtividade e garantam a sustentabilidade econômica e ambiental da atividade. Neste sentido o cultivo em meio à bioflocos pode ser uma importante alternativa na produção de proteína animal com um mínimo de impacto ambiental às regiões estuarinas. Ademais, o cultivo em bioflocos em baixa salinidade abre espaço para o cultivo em regiões interiores, longe de áreas protegidas, por meio da utilização de aquíferos contendo água salgada e da salga artificial da água de cultivo. Uma vez que o sistema pode ser operado sem renovação e com reutilização da água por diversos ciclos de cultivo, torna-se economicamente viável a utilização da salga artificial.

Alcalinidade

Alcalinidade representa a capacidade de um sistema aquoso em neutralizar ácidos até um determinado pH (efeito tampão da água). Este efeito tampão está relacionado principalmente à presença de bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos. Nos cultivos de camarões estes compostos são alterados por duas vias principais: absorção de bicarbonato pelos camarões durante a calcificação do exoesqueleto e na mobilização do íon amônio pelo fitoplâncton e microorganismos. Para cada grama de amônio removido do sistema por diferentes microorganismos são consumidos: 3,13 g de bicarbonato pelo fitoplâncton ou 7,05 g por bactérias autotróficas (nitrificação) ou ainda 3,57 g se assimilado por bactérias heterotróficas na presença de carboidrato como fonte de carbono (Ebeling *et al.* 2006). Assim geralmente suplementa-se o sistema de produção com produtos popularmente conhecidos como cal virgem (óxido de cálcio - CaO), barrilha (carbonato de sódio - Na₂CO₃) ou calcário (carbonato de cálcio - CaCO₃) com o objetivo de manter o pH em níveis aceitáveis durante o cultivo. Até o presente momento, não existe um consenso sobre os níveis ideais de alcalinidade para o cultivo de camarões marinhos. Para sistemas convencionais, alguns autores (Boyd & Tucker 1998) recomendam alcalinidades superiores a 100mg/L, mas para sistemas BFT a incerteza é ainda maior, já que não temos conhecimento de nenhum estudo que tenha abordado o tema até o presente momento. Assim, no capítulo I da presente tese de doutorado, estão apresentados os dados referentes à influência dos níveis de alcalinidade na sobrevivência e no crescimento de *Litopenaeus vannamei* criado em sistema BFT em diferentes salinidades.

Cultivo em baixa salinidade

O custo mais elevado das terras em regiões costeiras e a legislação ambiental limitam a expansão da aquicultura e o cultivo em locais afastados da costa pode ser uma solução para este problema. Estudos recentes têm focado no cultivo de *L. vannamei* em águas oligohalinas e em águas artificiais obtidas através da mistura de sais (Laramore 2001, McGraw *et al.* 2002, Atwood *et al.* 2003, Saoud *et al.* 2003). A tolerância de *L. vannamei* a uma grande amplitude de salinidades (0,5 – 40) torna esta espécie indicada para o cultivo em baixa salinidade (Samocha *et al.* 1998, McGraw *et al.* 2002).

Van Wyk & Scarpa (1999) relataram menores taxas de crescimento e sobrevivência em água com salinidade 0,5 se comparado a salinidades mais elevadas. Em estudos com mistura de sais, Atwood *et al.* (2003) e Sowers *et al.* (2005) não encontraram nenhuma disfunção osmótica, entretanto, o crescimento e a sobrevivência não foram tão satisfatórios quanto os obtidos nos tratamentos com água do mar diluída. Mais recentemente, Araneda *et al.* (2008) realizaram um experimento com camarões cultivados em água doce e obtiveram resultados satisfatórios, a taxa de sobrevivência encontrada foi de 76%, entretanto, o ganho de peso foi cerca de duas a quatro vezes inferior a outros trabalhos realizados com salinidade superior (Samocha *et al.* 2004, Sowers & Tomasso 2006).

Uma possibilidade para melhorar os resultados obtidos em baixa salinidade seria a adição de sais na ração, contudo esta estratégia não apresentou bons resultados em águas oligohalinas naturais e em mistura de sais (Sowers *et al.* 2005), assim outra opção seria a adição dos sais na água. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito da adição de cálcio na água de cultivo e seus efeitos sobre o desempenho de *L. vannamei*. Desta maneira os capítulos II e III desta tese abordam o efeito da adição de cálcio sobre o crescimento, sobrevivência, excreção de nitrogênio amoniacal, respiração e atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase sobre juvenis de *L. vannamei*

exposto as salinidades 2, 4 e 8 e a 4 diferentes concentrações de cálcio (água do mar diluída, 118, 236 e 354 mg/L).

CAPITULO I Efeito da Salinidade e da Alcalinidade no Crescimento e Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* Cultivado em Sistema de Bioflocos.

Abstract

The objective of the current work was to evaluate the effects of salinity and alkalinity on the zootechnical performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in biofloc system. The study was carried out in two phases: a nursery stage (0.22 ± 0.04 g), in which shrimp were stocked for 28 days at a stocking density of one shrimp/L, and a grow-out phase, in which shrimp were stocked from the nursery stage at a lower density (0.3 shrimp/L) for 21 days. The salinities tested were 2, 12 and 24 and the alkalinities were 50, 125 and 200 mg/L. During the nursery phase there was a mass mortality in the treatment that had a salinity of 2 and an alkalinity of 200 mg/L. This mortality event was due to ammonia and nitrite build up combined with higher pH values. The other treatments produced no significant differences ($p>0.05$) between the final biomasses, indicating that shrimp can be reared at salinities of 2 to 24 with similar results. During the grow-out phase, higher survival and final biomasses were recorded in the salinities 12 and 24. In summary, producing shrimp at higher salinities is safer, but the same results can be achieved at lower salinities if ammonia and nitrite are kept under control.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da salinidade e da alcalinidade no desempenho zootécnico do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos. O estudo foi conduzido em duas fases: uma fase de berçário ($0,22 \pm 0,04$ g), com duração de 28 dias e densidade de estocagem de um camarão por litro e uma fase de engorda, estocada com camarões provenientes da fase de berçário, a uma densidade de 0,3 camarões por litro. A fase de engorda teve duração de 21 dias. As salinidades testadas foram 2, 12 e 24 e as alcalinidades foram 50, 125 e 200 mg/L de CaCO_3 . Na fase de berçário, foi observada mortalidade superior a 70% no tratamento com salinidade 2 e alcalinidade 200 mg/L. Esta mortalidade foi associada ao aumento na concentração de amônia e nitrito que combinados a baixa salinidade e ao pH mais elevado deste tratamento tornam os camarões mais suscetíveis aos compostos nitrogenados. Os outros tratamentos estudados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a biomassa final indicando que o berçário de *L. vannamei* pode ser realizado em salinidades entre 2 e 24 com crescimento e sobrevivência semelhantes. Durante a fase de engorda os melhores resultados de crescimento e sobrevivência foram encontrados nas salinidades 12 e 24 sem nenhum efeito da alcalinidade nestas salinidades. Com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que o cultivo em salinidades iguais ou superiores a 12 é mais seguro, mas resultados semelhantes podem ser obtidos em salinidades inferiores se medidas emergenciais (*i.e.* renovação de água) para o controle da amônia e nitrito forem adotadas.

Introdução

O camarão marinho *L. vannamei* é uma espécie tropical amplamente cultivada ao redor do globo. Nas últimas décadas, o preço mais elevado das terras em regiões costeiras e o aparecimento de enfermidades nestes locais tem atraído pesquisadores e produtores para o cultivo desta espécie em áreas mais afastadas da costa. *L. vannamei* é geralmente escolhido como a espécie alvo para o cultivo em regiões continentais devido ao seu bom desempenho zootécnico em águas oligohalinas (Sowers *et al.* 2005, Araneda *et al.* 2008, Roy *et al.* 2010, Maicá *et al.* 2012).

Até o momento não existe consenso sobre a salinidade ideal para a criação de *L. vannamei*, estudos demonstram que o crustáceo tolera uma amplitude de salinidade variando de 0 a mais de 35 ppmil (Bucke *et al.* 2006, Araneda *et al.* 2008, Maicá *et al.* 2012). O cultivo em áreas continentais pode trazer benefícios como aumento de biossegurança e diminuição de custos para compra do espaço físico, entretanto, salinidades maiores exercem um efeito protetor contra a toxicidade da amônia e do nitrito (Lin & Chen 2001, 2003) conferindo maior segurança ao cultivo em águas salgadas.

Boyd & Tucker (1998) recomendam alcalinidade mínima de 75 mg/L de CaCO₃ para a manutenção do pH em nível aceitável para a criação de *L. vannamei* em viveiros convencionais. Nos sistemas tradicionais ocorre uma variação diurna nos valores de pH devido a grande captação de CO₂ pelo fitoplâncton durante o dia (aumento do pH) e aumento da concentração do CO₂ durante a noite (diminuição do pH), quando os processos fotossintético são interrompidos. Em sistemas de bioflocos (BFT), o metabolismo heterotrófico é geralmente predominante aos processos autotróficos (respiração > produção de O₂). A adição de uma fonte de carbono lábil geralmente é realizada para favorecer as bactérias

heterotróficas na competição por nitrogenados com o fitoplâncton (Silva *et al.* 2013). Com o aumento destas bactérias forma-se uma grande quantidade de material em suspensão (concentrações entre 300 e 1000 mg/L são usuais) que diminuem a penetração de luz diminuindo a fotossíntese. Em outras palavras, no sistema BFT, variações no pH acontecem de maneira progressiva e oscilações diurnas são de menor importância. Nossa hipótese é que o sistema possa ser operado com sucesso em alcalinidades menores do que os sistemas tradicionais. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito combinado de diferentes níveis de alcalinidade e diferentes salinidades no berçário e na engorda de *L. vannamei* cultivado em BFT.

Material e Métodos

Obtenção dos camarões e desenho experimental

O experimento foi conduzido na Estação Marinha de Aquicultura (EMA/FURG). Os náuplios de *L. vannamei* foram adquiridos da empresa Aquatec (Canguaretama, RN) e mantidos no setor de larvicultura da EMA até alcançarem peso médio de 0,2g. As unidades experimentais eram constituídas de 27 tanques circulares de fibra de vidro com 210 L de volume útil e 0,5 m² de área de fundo. As salinidades experimentais foram obtidas diluindo-se água do mar previamente filtrada com água da torneira previamente desclorada pelo período de 10 dias. Os níveis de alcalinidade foram ajustados adicionando hidróxido de cálcio e ácido clorídrico. A temperatura foi controlada utilizando-se aquecedores elétricos com termostato. Não foi realizada renovação ou troca de água durante todo o período experimental, apenas reposição da água perdida por evaporação.

O estudo foi realizado em duas fases distintas: uma fase de berçário, com camarões de $0,22 \pm 0,04$ g de peso médio, estocados a uma densidade de um camarão por litro durante 28

dias e uma fase de engorda, com camarões provenientes da fase de berçário, estocados com densidade menor (0,3 camarões por litro) durante 21 dias (peso inicial disponível na tabela 3).

Nas duas fases foi montado um experimento bifatorial, completamente aleatorizado, com três réplicas para cada tratamento. Os níveis de alcalinidade testados foram 50, 125 e 200 mg/L de CaCO_3 e as salinidades utilizadas foram 2, 12 e 24. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (PotyMar ®, 40% proteína, 8% lipídeos durante a fase de berçário e 38% proteína e 8% lipídeos durante a fase de engorda). A ração era ofertada em bandejas de alimentação e a quantidade ajustada de acordo com o consumo observado (tabelas de alimentação disponíveis em Jory *et al.* 2001).

Desempenho dos camarões

Semanalmente, 50 camarões (berçário) ou 15 camarões (engorda) eram gentilmente coletados de cada unidade experimental e individualmente pesados (precisão 0,01g). Após a pesagem, os camarões eram devolvidos aos tanques. No final de cada fase, os tanques foram esvaziados e os camarões eram contados e individualmente pesados para o cálculo da sobrevivência, peso final, ganho em peso, taxa de crescimento específico (SGR) e biomassa total. A conversão alimentar aparente (FCR) foi calculada pelo quociente entre o total de ração ofertado (g) e a biomassa final (g) em cada tanque.

Variáveis Físicas e Químicas

Temperatura, oxigênio dissolvido (OD), pH, salinidade (YSI 556 MPS Multiprobe, Yellow Spring Instrument, Yellow Spring, OH, USA) e nitrogênio amoniacal (TAN) (UNESCO 1983) foram aferidos diariamente. Alcalinidade (APHA 1998) e nitrito (Strickland & Parsons 1973) foram determinados a cada dois dias. Nitrato (Strickland & Parsons 1973), material particulado em suspensão (Strickland & Parsons 1973) e volume do floco (FV)

(Eaton *et al.*1995) foram medidos a cada 7 dias.

Adição de Carbono

O controle do nitrogênio amoniacal total foi realizado pela adição de uma fonte de carbono lábil (melaço de cana). A adição de uma fonte de energia rica em carbono e pobre em nitrogênio cria um ambiente favorável para a absorção direta da amônia pelas bactérias heterotróficas (Kirchmann 2008). O protocolo de adição de carbono foi adotado seguindo o modelo teórico descrito por Avnimelech (1999) adicionando-se 10 gramas de carbono para cada grama de nitrogênio amoniacal dissolvido no sistema.

Análise Estatística

Os dados foram testados para verificar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade e posteriormente submetidos à ANOVA de duas vias ao nível de significância de 0,05. Quando encontrado efeito significativo o teste *post-hoc* de Tukey HSD foi aplicado. Dados de sobrevivência foram transformados ($\arcseno x^{-0,5}$) para se aproximarem da distribuição normal.

Resultados

Berçário

A temperatura média durante o experimento foi de $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (média \pm EP) a concentração de oxigênio dissolvido (OD) oscilou entre 3,4 e 8 mg/L. Não foram encontradas diferenças significativas para temperatura e OD entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os valores de pH foram maiores nos tratamentos com maiores alcalinidades (125 e 200 mg/L – ALK125 e

ALK200) do que nos tratamentos com alcalinidade 50 (ALK50) ($p < 0,05$). Os valores médios para as variáveis físicas e químicas estão disponíveis na tabela 1. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) para a concentração média de nitrogênio amoniacal (TAN) nos tratamentos estudados. A concentração média de TAN nos tratamentos ALK50, ALK125 e ALK200 foram $2,9 \pm 0,36$, $2,11 \pm 0,28$, e $1,82 \pm 0,32$ mg/L, respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas para a concentração de nitrito entre as salinidades ($p < 0,05$). As maiores concentrações de nitrito foram detectadas nos tratamentos de salinidade 12 e 24 (SAL12 e SAL24). As concentrações médias de nitrito nos tratamentos SAL2, SAL12 e SAL24 foram $5,5 \pm 1,0$, $9,44 \pm 1,14$, e $10,83 \pm 1,3$ mg/L, respectivamente.

O desempenho zootécnico dos camarões pode ser observado na tabela 2. Em uma das réplicas no tratamento SAL2-ALK200 ocorreu mortalidade total. As maiores taxas de sobrevivência foram encontradas nas SAL12 e SAL24, entretanto nenhuma diferença significativa foi encontrada entre salinidade, alcalinidade ou a interação entre esses dois fatores ($p > 0,05$). O menor ganho em peso foi encontrado no tratamento SAL2-ALK50 ($0,82 \pm 0,09$ g) e no tratamento SAL12-ALK50 ($1,1 \pm 0,06$ g) e os maiores encontrados nos tratamentos SAL12-ALK125 ($1,35 \pm 0,09$ g) e SAL12-ALK200 ($1,38 \pm 0,11$ g). De maneira semelhante ao ganho em peso, os melhores FCR foram encontrados nos tratamentos SAL12-ALK125 e SAL12-ALK200 e os piores FCR e SGR foram encontrados no tratamento SAL2-ALK50 ($p < 0,05$)

Engorda

A temperatura média e a concentração de OD foram $27,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $6,5 \pm 0,1$ mg/L, respectivamente, não ocorreram diferenças significativas para essas variáveis. A concentração de OD variou entre 4,82 e 8,2 mg/L. Os valores de pH apresentaram o mesmo padrão

observado na fase de berçário com os maiores valores no tratamento ALK200. Valores médios para as variáveis físicas e químicas podem ser observadas na tabela 3. As maiores concentrações de TAN foram observadas nos tratamentos ALK50 e as menores nos tratamentos ALK200 ($p < 0,05$), nenhuma diferença significativa foi observada entre as salinidades testadas ($p > 0,05$). Os valores médios (media \pm EP) das concentrações de TAN nos tratamentos ALK50, ALK125 e ALK200 foram $0,6 \pm 0,07$, $0,33 \pm 0,03$, e $0,25 \pm 0,04$ mg/L, respectivamente. As concentrações de nitrito foram mais elevadas nos tratamentos ALK200 e menores nos tratamentos com salinidade 12 (SAL12). As concentrações médias de nitrito nos tratamentos ALK50, ALK125 e ALK200 foram $2,86 \pm 0,4$, $2,7 \pm 0,37$, e $5,0 \pm 0,6$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas para FV e TSS entre os tratamentos estudados ($p > 0,05$).

O desempenho zootécnico dos camarões na fase de engorda pode ser observado na tabela 4. A menor taxa de sobrevivência foi observada no tratamento SAL2-ALK125 (45%), seguida pelo tratamento SAL2-ALK200 (66%). A maior taxa de sobrevivência ocorreu nos tratamentos com 24 de salinidade com 100% de sobrevivência em todas as réplicas. O maior SGR e ganho de peso ocorreram nos tratamentos SAL2-ALK50, SAL2-ALK125, SAL2-ALK200 e SAL24-ALK125. No tratamento SAL24-ALK125 foi encontrado o maior peso final, o pior resultado aconteceu no tratamento SAL12-ALK50, o restante dos tratamentos apresentaram resultados similares sem diferença significativa ($p > 0,05$).

Discussão

Durante toda a realização do experimento, a temperatura esteve dentro do limite recomendado para o crescimento ótimo de *L. vannamei* (Van Wyk & Scarpa 1999). A concentração média de OD esteve acima de 5mg/L durante a maior parte do experimento, no

entanto, concentrações de até 3mg/L foram medidas após a adição de melaço, durante picos de amônia na fase de berçário. Apesar desses episódios de concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de valores ideais, acreditamos que esta variável foi de pouca importância para a explicação dos resultados zootécnicos obtidos neste trabalho. Os valores médios de pH oscilaram entre 7,4 e 8,3 e, apesar desses valores serem aceitáveis para o crescimento e sobrevivência do camarão (Van Wyk & Scarpa 1999), nos tratamentos com menor salinidade e maior alcalinidade (por conseguinte maior pH) os camarões se tornam mais suscetíveis a toxicidade combinada da amônia e nitrito resultando em mortalidade, como observado no tratamento SAL2-ALK200.

Em sistemas fechados, sem renovação de água, o acúmulo de compostos nitrogenados como amônia e nitrito tem efeitos deletérios no crescimento e sobrevivência dos camarões. Diversos autores (Lin & Chen 2001, Lin & Chen 2003, Schuler *et al.* 2010) demonstram a toxicidade do nitrito e da amônia assim como um efeito sinérgico entre esses dois compostos e o efeito protetor da salinidade na toxicidade desses compostos. Durante a fase de berçário, a concentração de amônia atingiu seu máximo no dia 10, com valores médios em torno de 10,5 mg/L. A concentração de nitrito alcançou níveis prejudiciais após 10 dias. A concentração máxima de nitrito para os tratamentos de 2 de salinidade foi mensurada nos tratamentos SAL2-ALK125 (30 mg/L), seguido por SAL2-ALK50 (21,4 mg/L) e SAL2-ALK200 (13,2 mg/L). Não obstante, as maiores concentrações de nitrito encontradas nos tratamentos com as menores alcalinidades, a sobrevivência foi satisfatória nesses tratamentos. No tratamento SAL2-ALK200, entretanto, ocorreu mortalidade total em dois tanques. A mortalidade observada nesse tratamento pode ser explicada pelo efeito tóxico combinado da amônia e do nitrito. Valores maiores de pH deslocam a equação íon amônio ↔ gás amônia

para a direita aumentando a toxicidade (o gás amônia é mais tóxico que o íon amônio, a proporção entre esses é regulada principalmente pelo pH) e por conseguinte a mortalidade.

A adição de melão de cana (carbono) se mostrou útil para estimular a mobilização do nitrogênio amoniacal durante o seu pico no dia 10 da fase de berçário (dado não apresentado). Todavia, a adição de melão esteve limitada à concentração de oxigênio dissolvido na água de cultivo, uma vez que uma dose elevada de melão de cana poderia acarretar na redução dos valores de OD e morte dos organismos. Desta maneira, a adição de melão era feita em conjunto com a monitoração dos valores de OD, sempre que a concentração de OD se aproximava a 3 mg/L a adição de carbono era suspensa. A concentração de TAN diminuía após a adição de carbono, mas voltava a subir após algumas horas necessitando de novas aplicações. Dois dias após o pico na concentração de TAN um aumento abrupto na concentração de nitrito foi observado. A adição de carbono não teve nenhum efeito notável na concentração de nitrito da água de cultivo e, como o sistema foi rodado sem renovação, os camarões ficaram expostos a concentrações deletérias por 7 dias, quando o processo de nitrificação começa a reduzir a concentração de nitrito transformando-o em nitrato.

No final da fase de berçário (tabela 2) todos os tratamentos produziram a mesma biomassa (réplicas com mortalidade total foram retiradas dos cálculos), indicando que apesar da toxicidade dos compostos nitrogenados, *L. vannamei* pode ser criado nas três salinidades e alcalinidades testadas se forem tomadas medidas de emergência para conter o aumento nas concentrações de TAN e nitrito.

O aumento nas concentrações de nitrito e TAN nos estágios iniciais do cultivo com sistema BFT também foi relatado por outros autores (Maicá *et al.* 2012, Silva *et al.* 2013). Algumas estratégias para conter o aumento nas concentrações de compostos nitrogenados

incluem o reuso total ou parcial de água proveniente de cultivos anteriores (contendo flocos colonizados com bacterias nitrificantes) (Krummenauer *et al. in press*), inoculação de biofilmes maduros (Thompson *et al.* 2002, Schweitzer *et al.* 2013). Se nenhuma dessas estratégias puder ser adotada, o produtor deve evitar o cultivo em salinidade baixa se não existir uma fonte de água de qualidade para renovação de emergência.

Embora não exista consenso sobre a alcalinidade ideal para o cultivo alguns autores (Van Wik & Scarpa 1999) sugerem que valores acima de 100 mg/L de CaCO₃ devem ser adotados. Entretanto, baseado nos dados obtidos neste estudo, para camarões cultivados em baixa salinidade em sistema BFT sugere-se que sejam adotados valores entre 50 e 100 mg/L de CaCO₃. Em sistemas BFT, a usual variação diurna nos valores de pH encontrada em sistemas tradicionais não acontece. Isso porque a luz é um fator limitante para o crescimento do fitoplâncton e o metabolismo heterotrófico é dominante e estimulado pela adição de carbono. Como resultado, maiores concentrações de alcalinidade e, por consequência, pH em baixa salinidade pode reduzir a produtividade porque estas condições aumentam os efeitos deletérios do nitrito e da amônia nos camarões. Esse efeito foi observado claramente durante a fase de engorda, onde, apesar da sobrevivência satisfatória, os maiores valores de biomassa final aconteceram nos tratamentos com salinidades 12 e 24 e os piores resultados aconteceram nos tratamentos SAL2ALK125 e SAL2ALK200.

Em resumo, baseado nos resultados apresentados no presente trabalho conclui-se que em salinidades superiores a 12, as alcalinidades testadas não apresentam um efeito marcante no crescimento e sobrevivência dos camarões. Na salinidade 2, entretanto, os camarões se tornam mais suscetíveis à toxicidade da amônia e do nitrito, logo valores menores de alcalinidade e pH devem ser empregados. Além disso, quando utilizando água com pouca salinidade torna-se necessário a utilização de estratégias para conter o aumento da amônia e

do nitrito. Amônia pode ser absorvida rapidamente da água com a adição de carbono, mas o nitrito exige estratégias mais elaboradas como a inoculação de biofloco maduro (Krummenaeur *et al.in press*), substratos artificiais e, em última instância, a renovação da água de cultivo.

Literatura Citada

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.

ARANEDA M, PEREZ, E, GASCALEYVA E. 2008. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight.

Aquaculture 283(1-4):13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.030.

BOYD CE, TUCKER CS. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

BÜCKLE LF, BENJAMÍN B, HERNÁNDEZ M. 2006. Osmoregulatory Capacity of the Shrimp *Litopenaeus vannamei* at Different Temperatures and Salinities, and Optimal Culture Environment. Rev. Bio. Trop. 54(3):745–53.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491614>.

EATON AD, CLESERCI LS, GREENBERG AE. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 10th edition. Amer. Pub. Health Assoc., Washington D.C.

KIRCHMAN, D. 2008. Microbial Ecology of the Oceans, 2nd Edition. 620p. ISBN: 978-0-470-04344-8

KRUMMENAUER D, SAMOCHA TM, POERSCH LH, LARA GR, WASIELESKY W. In Press. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in bft system. J. World Aquacult. Soc.

LIN YC, CHEN JC. 2011. Acute Toxicity of Ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone Juveniles at Different Salinity Levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259(1):109–119.

LIN YC, CHEN JC. 2003. Acute Toxicity of Nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles at Different Salinity Levels. Aquaculture 224:193–201.

MAICÁ PF, BORBA MR, WASIELESKY W. 2012. Effect of Low Salinity on Microbial Floc Composition and Performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles Reared in a Zero-water-exchange Super-intensive System. Aquac. Res. 43(3):361–370.

doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x.

ROY LA, DAVIS D, SAOUD IP, BOYD CA., PINE HJ, BOYD CE. 2010. Shrimp Culture in Inland Low Salinity Waters. Rev. Aquac.2:191–208. doi:10.1111/j.1753-5131.2010.01036.x.

SCHULER DJ, BOARDMAN GD, KUHN DD, FLICK GJ. 2010. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at Low Salinities. J. World Aquacult. Soc. 41(3): 438–446. <http://blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.2010.00385.x>.

SCHVEITZER R, ARANTES R, FRANCISCO M, FÓES P, COSTÓDIO S, VINATEA L, QUADROS W, ROBERTO E. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity , water quality and production rates. Aquacult. Eng. 54: 93–103.

SILVA KR, WASIELESKY W, ABREU PC. 2013. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 44(1):30-40.

SOWERS AD, GATLIN DM, YOUNG SP, ISELY JJ, BROWDY CL, TOMASSO JR. 2005. Responses of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in Water Containing Low Concentrations of Total Dissolved Solids. Aquac. Res. 36(8):819–823. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01270.x.

STRICKLAND JLH, PARSONS TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada.

THOMPSON FL, ABREU PC, WASIELESKY W. 2002. Importance of Biofilm for Water Quality and Nourishment in Intensive Shrimp Culture. Aquaculture 203:263–278.

UNESCO 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Pages 29–36 in Manual and guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

VAN WYK P & SCARPA J. 1999. Water quality requirements and management. In: Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems (ed. by P.VanWyk), pp.128-138. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL, USA.

Tabelas

Tabela 1. Média \pm erro padrão da salinidade, alcalinidade (mg/L de CaCO₃), pH, volume do floco (FV; mL/L), sólidos suspensos totais (TSS; mg/L), nitrogênio amoniacal (TAN; mg/L), nitrito (mg/L) e nitrato (mg/L) durante a fase de berçário de *Litopenaeus vannamei*. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tratamento	Salinidade	Alcalinidade	pH	FV	TSS	TAN	Nitrito	Nitrato
Sal2 Alk50	2.57 \pm 0.03a	58.14 \pm 2.71a	7.46 \pm 0.04a	11 \pm 1a	370 \pm 29ab	2.82 \pm 0.68a	5.92 \pm 1.53acd	3.58 \pm 0.86
Sal2 Alk125	2.6 \pm 0.04a	127.11 \pm 3.14b	7.99 \pm 0.03b	17 \pm 2a	507 \pm 33a	2.55 \pm 0.50a	8.88 \pm 2.21abcd	2.49 \pm 1.62
Sal2-Alk200	2.6 \pm 0.11a	213.52 \pm 6.8c	8.27 \pm 0.03c	15.0	186 \pm 102b	2.05 \pm 0.63a	1.71 \pm 0.85cd	0.74 \pm 0.64
Sal12-Alk50	11.8 \pm 0.15b	55.37 \pm 2.34a	7.4 \pm 0.04af	20 \pm 7a	560 \pm 121a	2.89 \pm 0.55a	9.63 \pm 1.74abcd	4.79 \pm 1.11
Sal12-Alk125	11.8 \pm .14b	128.5 \pm 3.56b	7.78 \pm 0.04dg	22 \pm 3a	588 \pm 53a	2.40 \pm 0.50a	9.41 \pm 2.44abcd	5.30 \pm 1.34
Sal12-Alk200	12.08 \pm 0.14b	206.3 \pm 3.22c	7.98 \pm 0.02beh	24 \pm 4a	342 \pm 90ab	2.01 \pm 0.48a	9.29 \pm 1.79abcd	6.5 \pm 1.93
Sal24-Alk50	24.86 \pm 0.2c	57.04 \pm 2.05a	7.28 \pm 0.04f	18 \pm 1a	493 \pm 64a	2.98 \pm 0.66a	4.06 \pm 1.02d	5.91 \pm 3.36
Sal24-Alk125	25.35 \pm 0.26c	123.9 \pm 2.22b	7.66 \pm 0.03g	20 \pm 3a	642 \pm 31a	1.39 \pm 0.45a	12.61 \pm 2.08a	5.08 \pm 1.47
Sal24-Alk200	24.79 \pm 0.24c	210.22 \pm 3.54c	8.04 \pm 0.01hb	21 \pm 1a	355 \pm 134ab	1.43 \pm 0.57a	15.82 \pm 2.61b	13.83 \pm 1.29

Tabela 2. Média \pm erro padrão do peso final (g), ganho de peso (g), crescimento específico (SGR; %/dia), conversão alimentar aparente (FCR), sobrevivência (%) e biomassa total (g) medidos no final da fase de berçário. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$). *Dado referente a uma réplica. Duas réplicas com mortalidade elevada foram retiradas para o cálculo do peso final, ganho de peso, SGR e FCR.

Tratamento	Peso Final	Ganho em Peso	SGR	FCR	Sobrevivência	Biomassa
Sal2 Alk50	1.04 \pm 0.09a	0.82 \pm 0.09a	3.93 \pm 0.46a	1.59 \pm 0.05a	86.66 \pm 8.4a	154.85 \pm 31.1a
Sal2 Alk125	1.45 \pm 0.1b	1.23 \pm 0.1b	5.43 \pm 0.35ab	1.65 \pm 0.11a	94.89 \pm 2.48a	207.3 \pm 18.9a
Sal2-Alk200*	1.53 \pm 0.16b*	1.3 \pm 0.16b*	5.9 \pm 0.43ab*	1.5*	28.86	67*
Sal12-Alk50	1.32 \pm 0.06a	1.1 \pm 0.06a	5.4 \pm 0.22ab	1.83 \pm 0.08a	88.44 \pm 0.97a	159.3 \pm 18.1a
Sal12-Alk125	1.58 \pm 0.094bc	1.35 \pm 0.09bc	6 \pm 0.26b	1.44 \pm 0.06c	97.55 \pm 0.59a	230.6 \pm 9.02a
Sal12-Alk200	1.61 \pm 0.11bc	1.38 \pm 0.11bc	5.86 \pm 0.4b	1.45 \pm 0.01c	96.22 \pm 1.56a	232.75 \pm 19.6a
Sal24-Alk50	1.34 \pm 0.09b	1.12 \pm 0.09b	5.22 \pm 0.32ab	1.48 \pm 0.05c	97.77 \pm 1.35a	197.16 \pm 10.11a
Sal24-Alk125	1.41 \pm 0.08b	1.19 \pm 0.08b	5.55 \pm 0.27b	1.88 \pm 0.08a	99.33 \pm 0.67a	209.88 \pm 6.44a
Sal24-Alk200	1.38 \pm 0.1b	1.16 \pm 0.1b	5.27 \pm 0.33ab	1.4 \pm 0.04cc	98 \pm 0.67a	204.83 \pm 15a

Tabela 3. Média \pm erro padrão da salinidade, alcalinidade (mg/L de CaCO₃), pH, volume do floco (FV; mL/L), sólidos suspensos totais (TSS; mg/L), nitrogênio amoniacal (TAN; mg/L), nitrito (mg/L) e nitrato (mg/L) durante a fase de engorda de *Litopenaeus vannamei*. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Tratamento	Salinidade	Alcalinidade	pH	FV	TSS	TAN	Nitrito	Nitrato
Sal2 Alk50	2.9 \pm 0.06a	45 \pm 2.4a	7.48 \pm 0.03a	13 \pm 2a	316.7 \pm 63.3a	0.61 \pm 0.13a	2.4 \pm 0.65a	3.31 \pm 1.47a
Sal2 Alk125	3.1 \pm 0.06a	136 \pm 2.7b	8 \pm 0.02b	17 \pm 3a	373.3 \pm 55a	0.38 \pm 0.03ab	4.9 \pm 0.93ab	2.07 \pm 0.82a
Sal2-Alk200	3.2 \pm 0.12a	197 \pm 3.8c	8.16 \pm 0.02c	19 \pm 2a	283.3 \pm 54.19a	0.46 \pm 0.03ab	4.75 \pm 1.14ab	0.74 \pm 0.74a
Sal12-Alk50	12.6 \pm 0.21b	45.8 \pm 2.9a	7.2 \pm 0.07a	22 \pm 3a	475 \pm 42.52a	0.7 \pm 0.1a	2.12 \pm 0.85a	4.973 \pm 2.42ab
Sal12-Alk125	12.4 \pm 0.2b	136.2 \pm 2.9b	7.98 \pm 0.02b	26 \pm 2a	536.7 \pm 78.23a	0.33 \pm 0.1ab	1.22 \pm 0.21a	7.89 \pm 4abc
Sal12-Alk200	12.1 \pm 0.13b	213.7 \pm 3d	8.2 \pm 0.02c	21 \pm 3a	536.7 \pm 74.3a	0.16 \pm 0.02b	2.41 \pm 0.55a	13.33 \pm 0.7bc
Sal24-Alk50	24.2 \pm 0.3c	60.6 \pm 1.96e	7.55 \pm 0.03a	16 \pm 1a	260 \pm 49.33a	0.51 \pm 0.04 a	3.95 \pm 0.5a	4.27 \pm 1.73a
Sal24-Alk125	24.4 \pm 0.37c	135 \pm 2.5b	7.98 \pm 0.02b	17 \pm 3a	380 \pm 59.23a	0.3 \pm 0.03ab	2.03 \pm 0.36a	5.49 \pm 1.12a
Sal24-Alk200	24.8 \pm 0.12c	226 \pm 2.3d	8.19 \pm 0.01c	19 \pm 5a	561.7 \pm 162.23a	0.14 \pm 0.05b	7.88 \pm 1.03b	15.02 \pm 1.72c

Tabela 4. Média \pm erro padrão do peso final (g), ganho de peso (g), crescimento específico (SGR; %/dia), conversão alimentar aparente (FCR), sobrevivência (%) e biomassa total (g) medidos no final da fase de engorda. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Tratamento	Peso Inicial	Peso Final	Ganho em Peso	SGR	FCR	Sobrevivência	Biomassa
Sal2 Alk50	1.38 \pm 0.015a	3.17 \pm 0.09a	1.8 \pm 0.09ab	3.74 \pm 0.16a	1.44 \pm 0.33ab	92 \pm 6.11ac	83.24 \pm 18.16bc
Sal2 Alk125	1.29 \pm 0.031a	3.08 \pm 0.14ac	1.79 \pm 0.13ab	3.88 \pm 0.21ab	2.08 \pm 0.11 ^a	45.33 \pm 5.82b	40.54 \pm 9.73a
Sal2-Alk200	1.14 \pm 0.017b	3.06 \pm 0.09ac	1.92 \pm 0.09a	4.53 \pm 0.15b	1.25 \pm 0.39b	66 \pm 18.58a	60.1 \pm 24.04ac
Sal12-Alk50	1.15 \pm 0.01b	2.67 \pm 0.07c	1.52 \pm 0.07b	3.73 \pm 0.13ab	1.47 \pm 0.27ab	94 \pm 6c	77.97 \pm 18bc
Sal12-Alk125	1.71 \pm 0.01c	3.22 \pm 0.09ab	1.5 \pm 0.09b	2.75 \pm 0.15c	1.55 \pm 0.26ab	82 \pm 14.19c	61.62 \pm 18.89bc
Sal12-Alk200	1.85 \pm 0.04e	3.44 \pm 0.08ab	1.6 \pm 0.08ab	2.88 \pm 0.13c	1.58 \pm 0.2ab	98 \pm 1.15c	77.78 \pm 8.49bc
Sal24-Alk50	1.56 \pm 0.02d	3.14 \pm 0.07a	1.58 \pm 0.07ab	3.19 \pm 0.11cd	1.2 \pm 0.09b	100c	92.53 \pm 3.95bc
Sal24-Alk125	1.67 \pm 0.02c	3.51 \pm 0.07b	1.84 \pm 0.07ab	3.44 \pm 0.1ad	1.06 \pm 0.14b	100c	112.38 \pm 10.52b
Sal24-Alk200	1.58 \pm 0.01d	3.2 \pm 0.07a	1.61 \pm 0.07ab	3.17 \pm 0.1cd	1.15 \pm 0.08b	100c	99.89 \pm 5.73bc

CAPITULO II Efeito da Adição de Cálcio no Crescimento e Sobrevivência do Camarão Branco (*Litopenaeus vannamei*) em Baixa Salinidade.

Abstract

The effect of different waterborne calcium concentration on survival and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was examined in the laboratory due to the interest of raising shrimp inland at low salinities. The experiment was conducted in 12 treatments (N = 4) with 3 different salinities (2, 4 and 8) and 4 calcium levels (diluted seawater with no calcium addition, 118, 236 and 354 mg/L). The shrimp (0.34 ± 0.1 g) were stocked in 5 L aquaria for 21 d and survival and growth were recorded at the end of the experiment. There was no significant difference for survival ($p > 0.05$). For weigh gain, there was no significant effect for salinity ($p > 0.05$) and interaction between salinity and calcium levels. Although, a significant difference between calcium levels ($p < 0.05$) was observed. A tendency of higher final weight in higher calcium concentrations was noticed, with higher weigh gain in treatment 354 mg/L (1.0 ± 0.06 g) followed by 236 mg/L (0.87 ± 0.04), 118 mg/L (0.82 ± 0.06) and diluted seawater (0.80 ± 0.05). It appears from this experiment that higher calcium concentration may enhance shrimp growth in low salinity and calcium supplementation may be a good choice for low salinity shrimp culture.

Resumo

A expansão da carcinocultura em regiões costeiras pode ser limitada pelo elevado custo dos terrenos e pelas restrições ambientais existentes nestas regiões. Desta forma, o cultivo em regiões interiores pode ser uma opção para mitigar tais problemas. Entretanto, diversos estudos relatam menor desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei* quando cultivado em águas oligohalinas. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da adição de diferentes concentrações de cálcio na água no ganho em peso e na sobrevivência de *L. vannamei* cultivado em baixas salinidades. O experimento teve duração de 21 dias e foi realizado com dois tratamentos em diferentes níveis: salinidade (2, 4 and 8) e concentração de cálcio (118, 236 and 354 mg/L e água do mar diluída sem adição de cálcio). A alcalinidade foi ajustada para 150 mg/ L com NaHCO_3 e as concentrações de cálcio foram obtidas pela adição de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. As unidades foram mantidas sem renovação de água. Ao final do experimento, o ganho em peso e a sobrevivência foram comparados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de tukey-HSD. Não foram encontrados efeitos significativos da salinidade nem da interação salinidade x concentração de cálcio para ganho em peso ou sobrevivência. O único efeito significativo encontrado foi para ganho em peso dentro das salinidades 2 e 4 na concentração de cálcio de 354 mg/L. As maiores biomassas foram encontradas nas salinidades 2 e 4 para o maior nível de cálcio (354 mg/L), entretanto, o mesmo não foi observado na salinidade 8, onde a variação nos níveis de cálcio não afetou o crescimento dos organismos de maneira significativa (ANOVA $p > 0,05$). Com base nos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que a adição de cálcio melhora o ganho em peso dos camarões cultivados em baixa salinidade, principalmente em salinidades iguais ou inferiores a

Introdução

A criação de camarões marinhos em ambientes afastados da costa é praticada em diversos países ao redor do globo, entre eles estão Brasil, EUA e China. O cultivo nesses ambientes é incentivado pelo preço mais acessível das terras no interior do continente e também pela legislação ambiental que é bastante restritiva e muitas vezes proibitiva para construção de fazendas na região litorânea. O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* tolera uma ampla faixa de salinidade sendo uma excelente escolha para o cultivo em baixa salinidade (McGraw *et al.* 2002, Araneda *et al.* 2008) e também cultivos realizados com salgas artificiais. (Atwood *et al.* 2003, Sowers *et al.* 2006).

O cálcio é um elemento importante na vida dos crustáceos. É requerido para a recalcificação do exoesqueleto durante a ecdise, atua como cofator em processos enzimáticos e diminui a permeabilidade das células ajudando na manutenção do equilíbrio iônico. Esse controle é fundamental para a aclimação de organismos estuarinos à baixa salinidade (Weil & Pantin 1931). Crustáceos marinhos como *L. vannamei* perdem uma quantidade considerável de cálcio durante a ecdise, a recalcificação do exoesqueleto é realizada, predominantemente, pela absorção de cálcio da água do mar (Drach 1939, Robertson 1960; Graf 1978). No ambiente marinho, a absorção de cálcio é realizada de maneira passiva através do canal de cálcio localizado nas brânquias. No caso de crustáceos eurihalinos submetidos à salinidade baixa, a absorção de cálcio é realizada ativamente no epitélio branquial (Neufeuld & Cameron 1993).

Apesar de tolerar bem salinidades baixas, *L. vannamei* geralmente apresenta menores taxas de crescimento e sobrevivência quando cultivado em salinidades baixas (especialmente inferiores a 4) se comparado à água marinha (Van Wyk *et al.* 1999, Araneda *et al.* 2008,

Maicá *et al.* 2012). Desta maneira, objetivo do presente trabalho foi verificar se a adição de cálcio a água de cultivo pode melhorar o crescimento e a sobrevivência de *L. vannamei* nas salinidades 2, 4 e 8.

Material e Métodos

Os aquários foram estocados a uma densidade de 2 camarões (peso médio \pm desvio padrão = $0,34 \pm 0.1$ g) por litro. Os náuplios de *L. vannamei* foram adquiridos do laboratório comercial Aquatec (Canguaratama, RN) e mantidos no setor de larvicultura da EMA até o início do experimento. Durante o experimento os animais foram alimentados com ração comercial (PotyMar, São Paulo – SP - 38% de proteína bruta e 8% de lipídeos) duas vezes ao dia a uma taxa de 8% da biomassa total.

Todo o experimento foi conduzido na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande (EMA/FURG). O experimento foi desenhado em 2 fatores: salinidade (2, 4 e 8) e concentração de cálcio (água do mar diluída sem adição de cálcio, 118 mg/L, 236mg/L e 354 mg/L Ca); totalizando 12 tratamentos com 4 repetições. As unidades experimentais eram compostas de 48 aquários (5 L volume total, 3 L volume útil) aleatoriamente dispostas em banho termostaticado com temperatura controlada ($28 \pm 1^\circ\text{C}$)

O nível da água e a salinidade eram monitorados diariamente e, se necessário, o nível era repostado com água destilada para evitar variações de salinidade devido à evaporação. Após a correção da salinidade, as fezes e restos orgânicos eram gentilmente sifonados para fora das unidades. A água dos aquários era totalmente substituída a cada 3 dias com água de reposição previamente padronizada para a salinidade e a concentração de cálcio do tratamento.

Amostras para determinação de nitrogênio amoniacal (UNESCO 1983) e nitrito (Strickland & Parsons 1973) eram coletadas a cada 3 dias previamente a renovação da água. Temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade eram mensurados diariamente (YSI 556 MPS Multiprobe. Yellow Spring Instrument, Yellow Spring, OH, USA).

Preparação do Meio de Cultivo e Determinação da Concentração de Cálcio

O meio experimental foi preparado diluindo-se água do mar previamente filtrada (filtro de areia e malha de 5 micrômetros) com água destilada até atingir as salinidades 2, 4 e 8. As diferentes concentrações de cálcio foram obtidas adicionando CaCl_2 à água do mar diluída. Após a adição do cloreto de cálcio a solução era acondicionada em recipientes de vidro de 30 L e mantida com suave aeração por 24 h. Após este período uma alíquota era coletada para determinação de cálcio por absorção atômica de chama (MicroNal, SP, Brazil).

As pós-larvas foram gradativamente aclimatadas para as salinidades experimentais adicionando-se água doce aos tanques de aclimação a uma taxa de 2-5 por dia. Quando a salinidade nos tanques de aclimação alcançou 10 diminuiu-se o ritmo de diluição para 1 de salinidade por dia. Após a aclimação, os camarões foram pesados e estocados para dar-se início ao experimento.

Análise Estatística

Todos os dados foram testados para verificar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade e posteriormente submetidos à ANOVA de duas vias ao nível de significância de 0,05. Quando encontrado efeito significativo o teste *post-hoc* de Tukey HSD

foi aplicado. Dados de sobrevivência foram transformados ($\arcseno x^{-0,5}$) para se aproximarem da distribuição normal.

Resultados

A temperatura média durante o experimento foi de $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (média \pm desvio padrão), a concentração de oxigênio dissolvido na água variou entre 5,8 e 8 mg/L e os valores de pH variaram entre 6,9 e 7,9. Não foi detectada diferença significativa para temperatura, pH e oxigênio dissolvido entre os tratamentos estudados ($p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas para a concentração de nitrito e nitrogênio amoniacal ($p > 0,05$). O maior valor de nitrogênio amoniacal (0,48 mg/L) foi encontrado no tratamento com salinidade 4 sem adição de cálcio e o maior valor de nitrito (1 mg/L) foi encontrado no tratamento com salinidade 8 e 236 mg/L de concentração de cálcio.

Os dados de sobrevivência podem ser observados na tabela 1. As maiores sobrevivências foram encontradas na salinidade 8 e concentração de cálcio 354 mg/L, as menores foram encontradas na salinidade 2 sem adição de cálcio, entretanto nenhum efeito significativo foi encontrado para a salinidade, concentração de cálcio ou para a interação entre esses dois fatores ($p > 0,05$). Os dados referentes ao peso final podem ser observados na figura 1. Não foi observado efeito significativo da salinidade ou da interação salinidade x concentração de cálcio no ganho de peso dos camarões ($p > 0,05$), contudo, a concentração de cálcio apresentou efeito significativo na explicação do ganho de peso dos camarões ($p < 0,05$).

Tabela 1. Sobrevivência (%) e biomassa final (g) de *Litopenaeus vannamei* nas salinidades e concentrações de cálcio testadas ao final de 21 dias de experimento. Valores médios \pm erro padrão.

Concentração de Ca	Salinidade		
	2	4	8
Água marinha diluída sem cálcio	91,6 ± 8,3 ^a	95,8 ± 4,2 ^a	91,6 ± 4,8 ^a
118 mg/L	95,8 ± 4,2 ^a	92,0 ± 4,0 ^a	95,8 ± 4,2 ^a
236 mg/L	92,0 ± 4,2 ^a	95,8 ± 4,2 ^a	91,6 ± 8,3 ^a
354 mg/L	87,0 ± 4,2 ^a	95,8 ± 4,2 ^a	95,8 ± 4,2 ^a
<i>Biomassa</i>			
Água marinha diluída sem cálcio	3,74 ± 1,2 ^a	4,75 ± 1,4 ^a	4,84 ± 0,9 ^{ab}
118 mg/L	4,94 ± 1,1 ^{ab}	4,50 ± 1,6 ^a	4,44 ± 0,7 ^{ab}
236 mg/L	5,10 ± 0,7 ^{ab}	5,20 ± 0,8 ^{ab}	4,25 ± 0,7 ^{ab}
354 mg/L	6,12 ± 0,7 ^b	5,80 ± 1,0 ^b	4,85 ± 1,7 ^{ab}

O maior ganho de peso foi encontrado na concentração de cálcio 354 mg/L ($1,0 \pm 0,06$ g), seguido por 236 mg/L ($0,87 \pm 0,04$), 118 mg/L ($0,82 \pm 0,06$) e água do mar diluída ($0,80 \pm 0,05$). Nota-se uma tendência de aumento no peso final com o aumento da concentração de cálcio nas salinidades 2 e 4, ademais, foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos com concentração de cálcio 354 mg/L e água do mar diluída nessas salinidades ($p < 0,05$). Essa tendência não foi encontrada na salinidade 8 onde não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de cálcio ($p > 0,05$).

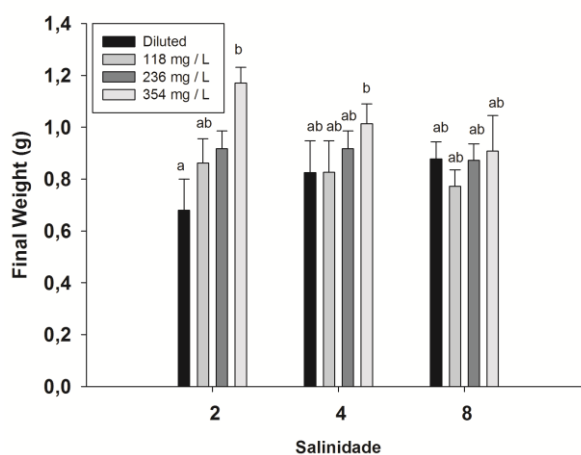


Figura 1. Peso final (g) médio dos camarões nas salinidades e concentrações de cálcio testadas (Diluída: água do mar diluída com água destilada – sem adição de cálcio) ao final de 21 dias de experimento. Barras verticais representam erro padrão. Diferentes letras demonstram diferença significativa (ANOVA $p < 0,05$)

Discussão

Os valores de temperatura, pH e a concentração de oxigênio dissolvido estiveram dentro dos limites recomendados para o cultivo de *L. vannamei* (Van Wyk & Scarpa 1999). As concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrito estiveram dentro dos limites de segurança para a espécie (Lin & Chen 2001, Lin & Chen 2003). Nenhuma diferença significativa entre os tratamentos foi encontrada para essas variáveis ($p > 0,05$).

Nas últimas décadas, estudos reportaram sucesso no cultivo de *L. vannamei* com baixa salinidade e até mesmo em água doce (Araneda *et al.* 2008). Bray *et al.* (1994) não encontraram diferenças significativas na sobrevivência entre juvenis (2 g) cultivados em 5 e 40. Samocha *et al.* (1998) encontraram resultados semelhantes para camarões cultivados em salinidade 2 e 8. Por outro lado, diversos estudos relatam uma piora no crescimento e sobrevivência em salinidades igual ou inferiores a 2. Maicá *et al.* (2012) relataram melhores resultados nas salinidades 25, 4 e 2, respectivamente. Laramore *et al.* (2001) encontraram 0% de sobrevivência em pós-larvas (0,1 g) após 21 dias de cultivo em água de salinidade 0, 0,5 e 1 e 40 e 60% de sobrevivência em salinidades 2 e 3, respectivamente.

Quando crustáceos marinhos são cultivados em salinidade baixa, geralmente se observa um retardo no crescimento, que geralmente é atribuído ao aumento no consumo de energia para manter o aparato osmorregulatório (Romano & Zeng 2006, Ye *et al.* 2009). O mecanismo ativo que mais consome energia para a ionorregulação é o transportador Na^+/K^+ ATPase (Lucu & Towle 2003), que geralmente tem sua atividade aumentada quando os organismos se encontram expostos a um ambiente com salinidade baixa (Piller *et al.* 1995,

López-Mañanes *et al.* 2002, Torres *et al.* 2007, Tsai & Lin, 2007, Lucu *et al.* 2008, Huong *et al.* 2010, Romano & Zeng 2010). O aumento no consumo de energia para a osmorregulação acarreta em menos energia disponível para o crescimento. Entretanto, na faixa de salinidade testado nesse estudo não foram encontradas diferenças significativas para crescimento ou sobrevivência. Nos tratamentos sem adição de cálcio (apenas água do mar diluída) nota-se uma tendência de melhora no crescimento com o aumento da salinidade, entretanto este aumento não foi estatisticamente significativo. Nas salinidades 2 e 4 a adição de cálcio teve um efeito bem marcado na melhora do crescimento dos camarões. Os camarões nos tratamentos com 354 mg/L de concentração de cálcio ganharam mais peso se comparados aos tratamentos sem adição de cálcio nessas salinidades ($p < 0,05$). Esses resultados podem ser explicados pela menor necessidade de absorção ativa de cálcio após a ecdise e pelo efeito impermeabilizante do cálcio sobre as membranas prevenindo a perda de íons do organismo para o meio, diminuindo os gastos com osmorregulação.

O transporte ativo de cálcio foi sugerido para *Austropotamobius pallipes* (Greenaway 1974) e para *Gammarus pulex* (camarão de água doce) (Wright 1979) em águas com baixa concentração de cálcio. Em indivíduos de *Callinectes sapidus* (Siri Azul) aclimatados a baixa salinidade é proposto que a movimentação do cálcio seja realizada de maneira ativa (Neufeld & Cameron 1992). Wood & Stickney (1989) relataram o efeito da concentração de cálcio na água na sobrevivência e crescimento de *Sciaenops ocellatus* (Red Drum). Os autores ligaram as maiores mortalidades e menor crescimento em águas com pouco cálcio com o efeito impermeabilizante do cátion nas brânquias e outras superfícies corporais. Altos níveis de cálcio diminuem a permeabilidade destas estruturas diminuindo a perda de íons do organismo para o meio e, por conseguinte, a energia utilizada para manutenção do balanço osmótico.

Concluindo, *L. vannamei* sobrevive e cresce satisfatoriamente no intervalo de salinidade e concentrações de cálcio testados. A adição de cálcio ao meio experimental melhorou o crescimento nas salinidades 2 e 4 e não teve efeito na salinidade 8. A suplementação de cálcio deve ser considerada no cultivo em baixa salinidade com concentrações de cálcio inferiores a 118 mg/L, especialmente durante os primeiros estágios de vida, quando os camarões perdem mais íons para o meio devido a maior relação superfície/volume (superfície exposta ao meio externo / volume corporal) (Ogawa 1975). Nesse período, devido à elevada taxa de crescimento, os organismos realizam a ecdise com mais frequência, tornando-se mais permeáveis e, além disso, para a recalcificação da carapaça pode ser necessária para a absorção ativa de cálcio da água o que acarreta em maior gasto energético e menor crescimento.

Literatura Citada

- ARANEDA, M, PEREZ E, GASCALEYVA E. 2008. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight. *Aquaculture* 283(1–4):13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.030
- ATWOOD, HL, YOUNG SP & TOMASSO JR. 2003. Survival and Growth of Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Postlarvae in Low-Salinity and Mixed-Salt Environments. *J. World Aquacult. Soc.* 34(4):518-523.
- BRAY, WA, LAWRENCE, AL & LEUNG-TRUJILLO JR. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture* 122: 136-146.

CASTILLE FL. & LAWRENCE AL. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68:75-80.

CHARMANTIER G, CHARMANTIER-DAVIES M, BOUORICHA N, THUET P, AIKEN DE, TRILLES JP. 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 175:102-110.

CHEN JC, LIN J, CHEN C & LIN M. 1996. Survival, growth and intermolt period of juvenile *Penaeus chinensis* (Osbeck) reared at different combinations of salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204:169-178.

DIWAN AD. 2005. Current Progress in Shrimp Endocrinology - A Review. *Indian J. Exp. Biol.* 43:209–233.

GREENAWAY P. 1974. Calcium balance at the postmolt stage of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *J. Exp. Biol.* 61:35–45.

GREENAWAY P. 1985. Calcium Balance and Moulting in the Crustacea. *Biol. Rev.* 60(3):425–454. .

GUNTER CJ & HILDEBRAND H. 1954. The relation of total rainfall of the state and catch of the marine shrimp (*Penaeus setiferus*) in Texas waters. *B. Mar. Sci. (Gulf and Caribbean)* 4:95-103.

GUNTER CJ, CHRISTMAS Y, KILLEBREW R. 1964. Some relations of salinity to population distributions of motile estuarine organisms, with special reference to penaeid shrimp. *Ecology* 45:181- 185.

HERKE WH, MW WENGERT & ME LAGORY. 1987. Abundance of young brown shrimp in natural and semi-impounded marsh nursery areas: relation to temperature and salinity. N. Gulf. Sci. 9:9-28.

HUONG DTT, YANG WJ, OKUNO A, WILDER MN. 2001. Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. Comp. Biochem. Physiol. A 128:317–326

JASMANI S, VIDYA J, SHINJI J & WILDER MN. 2010. Carbonic Anhydrase and Na/K-ATPase Activities During the Molt Cycle of Low Salinity-reared White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fisheries Sci. 76(2):219–225. doi:10.1007/s12562-009-0202-1.

KUMLU M & JONES DA. 1995. Salinity tolerance of hatchery-reared postlarvae of *Penaeus indicus* originating from India. Aquaculture 130:287296.

LARAMORE S, LARAMORE CR & SCARPA J. 2001. Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 32(4):385–392. doi:10.1111/j.1749-7345.2001.tb00464.x.

LIN YC & CHEN JC. 2001. Acute Toxicity of Ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone Juveniles at Different Salinity Levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259(1):109–119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325379>.

LIN YC & CHEN JC. 2003. Acute Toxicity of Nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles at Different Salinity Levels. Aquaculture 224:193–201. doi:10.1016/S0044-8486(03)00220-5.

LUCU C & TOWLE DW. 2003. Na⁺K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135:195–214.

LUCU C, PAVICIC J, IVANKOVIC D, PAVICIC HD, NAJDEK M. 2008. Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 149:362–372

MAICÁ PF, MAUDE RB & WASIELESKY W. 2012. Effect of Low Salinity on Microbial Floc Composition and Performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles Reared in a Zero Water Exchange Super Intensive System. *Aqua. Res.* 43(3):361-370.
doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x.

MAIR MCD. 1980. Salinity and water preferences of four species of postlarval shrimp (*Penaeus*) from West Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45:69-82.

MCGRAW WJ & SCARPA J. 2003. Minimum environmental potassium for survival of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in fresh water. *J. Shellfish Res.* 22:263-267.

NEUFELD DS & CAMERON JN. 1993 Transepithelial movement of calcium in crustaceans. *J. Exp. Biol.* 184:1–16

O'BRIEN CJ. 1994. The effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile tiger prawns *Penaeus esculentus* (Haswell). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 183:133-145.

OGAWA M. 1975. The effects of prolactin, cortisol and calcium-free environment on water influx in isolated gills of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52:539-543

OGLE JT, K. BEAUGEZ, & JM. LOTZ. 1992. Effects of salinity on survival and growth of post-larval *Penaeus vannamei*. *Gulf Res. Rep.* 8:415-421.

PILLER SC, HENRY PD, DOELLER JE & KRAUS DW. 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp. Biol.* 189:349–358.

ROBERTSON JD. 1960. Ionic regulation in the crab *Carcinus maenas* in relation to the moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 1:183-212

ROMANO N & ZENG C. 2012. Osmoregulation in Decapod Crustaceans: Implications to Aquaculture Productivity, Methods for Potential Improvement and Interactions with Elevated Ammonia Exposure. 2012. *Aquaculture* 334–337: 12–23.
doi:10.1016/j.aquaculture.2011.12.035.

STRICKLAND JLH. & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada

TORRES G, CHARMANTIER-DAURES M, CHIFFLET S, ANGER K. 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiology A* 147:460–465.

UNESCO 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Pages 29–36 in Manual and guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

VAN WYK P, DAVIS-HODGKINS M, LARAMORE CR, MAIN KL, MOUNTAIN J, SCARPA J. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. FDACS contract M520.

WEIL E & PANTIN CFA. 1931. The adaptation of *Gunda ulvae* to salinity. II. The water exchange. J. Exp. Bio. 8:73-81.

WRIGHT DA. 1979. Calcium Regulation In Intermoult Gammarus Pulex. J. Exp. Biol. 83:131–144.

WURTS W & STICKNEY RR. 1989. Responses of Red Drum (*Sciaenops Ocellatus*) to Calcium and Magnesium Concentrations in Fresh and Salt Water. Aquaculture 76(1–2):21–35. doi:10.1016/0044-8486(89)90248-2.

YE L, JIANG S, ZHU X, YANG Q, WEN W, WU K. 2009. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 290:140–144.

CAPITULO III Efeito da concentração de cálcio e da salinidade na respiração, excreção de nitrogênio amoniacal e na atividade da Na^+/K^+ ATPase em juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

Resumo

O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* é uma espécie tropical que tem sido cultivada com sucesso em salinidades que variam de próximo a zero até 45. Excreção e a respiração são utilizados como indicadores da taxa de metabolismo em crustáceos e como indicadores de stress quando estes são submetidos a salinidades baixas. A enzima Na^+/K^+ ATPase é um dos principais mecanismo de iono-osmorregulação em *L. vannamei*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes salinidades e concentrações de cálcio na respiração, excreção, osmolalidade e na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase na brânquia de *L. vannamei*. As salinidades testadas foram 2, 4 e 8 e as concentrações de cálcio foram: água do mar diluída sem adição de cálcio, 118, 236 e 354 mg/L. Os ensaios para determinação da taxa de excreção foram realizados durante 48h e o consumo de oxigênio foi realizado em incubações de 2h ambos foram realizados com os organismos em jejum. Após o ensaio de excreção 3 camarões foram amostrados para dissecação das brânquias e posterior análise da atividade enzimática da Na^+/K^+ ATPase. A excreção de nitrogênio amoniacal diminuiu com o aumento da salinidade e com o aumento da concentração de cálcio nas salinidades 2 e 8. O consumo de oxigênio diminuiu com o aumento da salinidade. Nos tratamentos com adição de cálcio esse padrão não foi observado. A adição de cálcio no meio experimental diminuiu o consumo de oxigênio nas salinidades 2 e 4. A osmolalidade da hemolinfa não variou com a salinidade ou com a concentração de cálcio. A atividade da Na^+/K^+ ATPase foi maior na salinidade 2 (117 ± 9) do que nas salinidades 4 (40 ± 11) e 8 (79 ± 13 mmol ADP mg proteína⁻¹ h⁻¹) ($p < 0.05$). A concentração de cálcio não teve efeito significativo sobre a atividade da enzima ($p > 0,05$). Os menores valores de excreção e respiração na salinidade 2 com adição de cálcio sugerem que maiores concentrações de cálcio podem ser benéficas a espécie em situações de baixa salinidade. A atividade da Na^+/K^+

ATPase pode ter sido inconclusiva para as concentrações de cálcio devido ao estágio de muda (os camarões utilizados estavam no período intermuda) no qual os camarões foram coletados. Para avaliar um possível efeito da concentração de cálcio na atividade dessa enzima é sugerido que os camarões sejam coletados nos períodos de pré e pós muda, quando o fluxo de cálcio pra calcificação/descalcificação da carapaça é mais intenso.

Abstract

Litopenaeus vannamei is a tropical species that has been successfully reared in a wide range of salinities. The aim of the present paper was to determine oxygen consumption, total ammonia nitrogen (TAN) excretion and Na⁺/K⁺ ATPase activity of *L. vannamei* juveniles exposed to different calcium concentrations at low salinity. The salinities tested were 2, 4 and 8 and the calcium concentration tested were: diluted sea water without calcium addition, 118, 236 and 354 mg/L. TAN excretion decreased with increased salinity level and decreases with increased calcium concentration in salinity 2 and 8. The respiration rates decreased with increasing salinity. In treatments with calcium addition this pattern was not observed. Calcium addition appears to diminish oxygen uptake in salinity 2 and 4. Hemolymph osmolality values did not change with salinity or calcium concentration ($p > 0.05$). Na⁺/K⁺-ATPase activity was higher in salinity 2 (11.75 ± 0.9) than in salinity 4 (4.05 ± 1.1) and 8 (7.9 ± 1.36) ($p < 0.05$). No differences were found for enzymatic activity between calcium concentration ($p > 0.05$). The reduced TAN excretion and oxygen consumption at salinity 2 in treatments with calcium addition suggest that higher calcium concentration might be beneficial to *L. vannamei* living in low salinity waters. The Na⁺/K⁺-ATPase activity values were inconclusive due to molting stage sampled (intermolt). To determine if waterborne calcium concentration have an effect on this enzyme activity tissue samples should be taken in pre-molt and early post-molt stages when calcium uptake and movement are more intense in crustaceans. Further studies should focus on long term effects of calcium concentration on energy sparring and shrimp growth to verify if calcium supplementation might be a feasible choice for shrimp cultivation in low salinity waters.

Introdução

A osmorregulação é definida como a regulação ativa da pressão osmótica e do volume hídrico de um organismo. Este processo é essencial para os crustáceos aquáticos já que permite a manutenção da homeostase mesmo em ambientes com concentrações osmóticas diferentes das encontradas nos fluídos corporais. Com exceção de organismos estritamente osmoconformadores, crustáceos aquáticos regulam constantemente os osmólitos da hemolinfa. A competência do processo osmorregulatório determina a amplitude de salinidade a qual determinada espécie pode ocupar. O camarão branco *Litopenaeus vannamei* tolera uma ampla faixa de salinidade (Araneda *et al.* 2008) é um forte regulador hiperosmótico em águas oligohalinas e igualmente forte regulador em água marinha (Roy *et al.* 2007) sendo a principal espécie cultivada na América Latina (Wurmann *et al.* 2004).

O consumo de oxigênio e a taxa de excreção são usados como indicativos de stress fisiológico em crustáceos decápodes (Nelson *et al.* 1977, Chen & Linn 1995). A respiração é também um indicador do gasto energético quando os camarões são submetidos a diferentes salinidades (Spaargaren *et al.* 1982, Chen & Nan 1993, Allan *et al.* 2006).

As brânquias são o principal órgão responsável pelo transporte ativo de Na^+ e Cl^- entre o organismo e o meio externo. Estudos realizados por Neufeuldt *et al.* (1980) e Towle (1981), demonstraram que a Na^+/K^+ ATPase é a principal enzima envolvida na captação ativa de Na^+ e desempenha papel importante na regulação iônica e hídrica em crustáceos eurihalinos.

Em ambiente oceânico, a absorção do cálcio se dá de maneira passiva através do canal de cálcio localizado na membrana apical. No caso de crustáceos eurihalinos adaptados em baixa salinidade ou em ambiente dulcícola, o transporte do ambiente para o organismo é realizado de maneira ativa no epitélio branquial (Neufeuldt & Cameron 1993). Não obstante, o

cálcio participa como cofator enzimático em diversos processos fisiológicos e diminui a permeabilidade iônica e hídrica das membranas ajudando na manutenção do controle osmótico. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da salinidade e de diferentes concentrações de cálcio no consumo de oxigênio, na excreção de nitrogênio amoniacal e na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias de *Litopenaeus vannamei*.

Material e Métodos

Animais e desenho experimental

O experimento foi conduzido na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande (EMA-FURG). Os náuplios de *Litopenaeus vannamei* foram adquiridos do laboratório AQUATEC (Canguaretama, RN) e mantidos no setor de larvicultura da EMA até sua utilização. A água utilizada no experimento foi preparada diluindo água do mar (captada em frente a EMA, salinidade 30) filtrada com água destilada. Todas as unidades experimentais (aquários de 5L) foram estocadas com 4 camarões ($1,8 \pm 0,3\text{g}$). As diferentes concentrações de cálcio foram obtidas com adição de CaCl_2 P.A.. Após a diluição do cálcio o meio foi mantido em aeração suave por 12 h e posteriormente foi realizada a determinação da concentração de cálcio por absorção atômica de chama (MicroNal, SP).

As pós-larvas foram gradativamente aclimatadas à baixa salinidade com adição de água doce aos tanques de aclimação. A salinidade era diminuída de 2 a 5 diariamente. Quando a salinidade dos tanques de aclimação chegou a 10 a salinidade foi diminuída em 1 por dia até as condições desejadas. Após a aclimação, os camarões foram imediatamente estocados em suas respectivas unidades experimentais. O experimento foi montado em 12

tratamentos e 2 fatores: salinidade (2, 4 e 8) e concentração de cálcio (água do mar diluída sem adição de cálcio, 118 mg/L, 236 mg/L e 354 mg/L), foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento. As unidades experimentais consistiam de 48 aquários de 5 L aleatoriamente arranjados em um banho termostaticado com temperatura controlada ($28 \pm 1^\circ\text{C}$). Cada aquário era equipado com uma pedra porosa para difusão de oxigênio.

Excreção de Nitrogênio Amoniacal

A excreção foi calculada multiplicando a diferença na concentração final e inicial de nitrogênio amoniacal (TAN) pelo volume de água dividido pelo peso úmido dos camarões e tempo de experimento (mg TAN/ g /h). A concentração de TAN foi determinada (UNESCO 1983) para cada unidade experimental no início e a cada 6 h de experimento durante um período de 48 h.

Consumo de Oxigênio (respirometria)

Para medir o consumo de oxigênio os camarões foram encubados em frascos de DBO (volume aproximado 300 mL) contendo meio experimental. Um indivíduo era colocado em cada frasco e deixado em repouso e no escuro por 30 minutos, para evitar qualquer efeito da manipulação sobre o consumo de oxigênio. Após este período, a água era gentilmente renovada, os frascos tampados e incubados no banho termostaticado descrito nas seções anteriores. A incubação foi realizada durante 2 h. A concentração de oxigênio dissolvido foi determinada por titulação (Grasshoff 1983). O consumo de oxigênio foi calculado multiplicando a diferença da concentração de oxigênio após o final da incubação pelo volume do frasco dividido pelo volume do frasco e peso do camarão (mg O_2 /g /h). Adicionalmente,

três frascos contendo apenas água (brancos - sem camarão) foram incubados para subtrair o consumo de oxigênio por microorganismos.

Atividade da Na^+/K^+ ATPase e Osmolalidade da Hemolinfa

Imediatamente após a coleta da última amostra para excreção de nitrogênio amoniacal, 4 camarões foram crio-anestesiados para coleta de hemolinfa e dissecação das brânquias. A hemolinfa foi coletada por punção cardíaca e imediatamente congelada em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise utilizando um osmômetro de pressão de vapor (Vapro 5600, Wescor, Logan, UT, USA).

As brânquias foram removidas, gentilmente secas em papel filtro e armazenadas em ultrafreezer para posterior análise. Para a determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase uma alíquota de tecido foi homogenizada em 200 μL de tampão de homogeneização (300 mM sucrose, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 100 mM imidazole, pH 7.3) e centrifugados (10.000 G; Mikro22R; Hettich, Germany) a 4°C, por 1 minuto. A atividade da enzima foi mensurada no sobrenadante seguindo a metodologia descrita por McCoermick (1993), por meio da diferença na produção de ADP em solução com e sem oubaina (inibidor da enzima Na^+/K^+ ATPase). Os ensaios foram realizados com 3 réplicas a 20°C utilizando um leitor de microplacas (Victor 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Waltham MA, USA) durante 10 min. Uma curva padrão de ADP foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática. A quantidade de proteína no sobrenadante foi determinada utilizando um kit comercial (Microprote, Doles Ltda., GO, Brasil). A atividade enzimática foi determinada em mmoles ADP mg /proteína /hora.

Resultados

A excreção de TAN diminuiu com o aumento da salinidade e diminuiu com o aumento da concentração de cálcio nas salinidades 2 e 8. Na salinidade 4 o oposto foi observado com a maior taxa na concentração de 354 mg/L de cálcio. Foram encontradas diferenças significativas entre as salinidades ($p < 0,05$). A concentração de cálcio não exerceu efeito significativo sobre a excreção de TAN ($p > 0,05$). A excreção média de TAN nas salinidades 8, 4 e 2 foram $0,014 \pm 0,001$, $0,019 \pm 0,001$ e $0,027 \pm 0,001$ mg TAN /g /h, respectivamente.

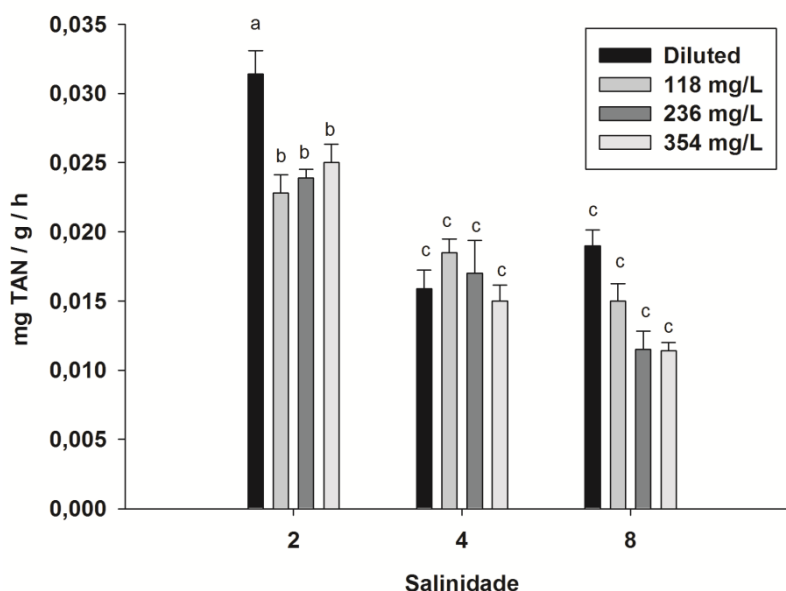


Figura 1. Excreção média de nitrogênio amoniacal (TAN) por *Litopenaeus vannamei* nas salinidades 2, 4 e 8 e nas concentrações de cálcio: diluída (água do mar diluída sem adição de cálcio), 118, 235 e 354mg/L. Taxa de excreção expressa em mg TAN g⁻¹ h⁻¹. Linhas verticais acima das barras denotam o erro padrão.

O consumo de oxigênio (figura 2) diminuiu com o aumento da salinidade nos tratamentos sem adição de cálcio. Nos tratamentos nos quais o CaCl₂ foi adicionado, o mesmo padrão não foi observado. Aparentemente a adição de cálcio diminuiu o consumo de oxigênio nas salinidades 2 e 4, entretanto não foram encontradas diferenças significativas entre salinidade ou concentração de cálcio ($p > 0,05$).

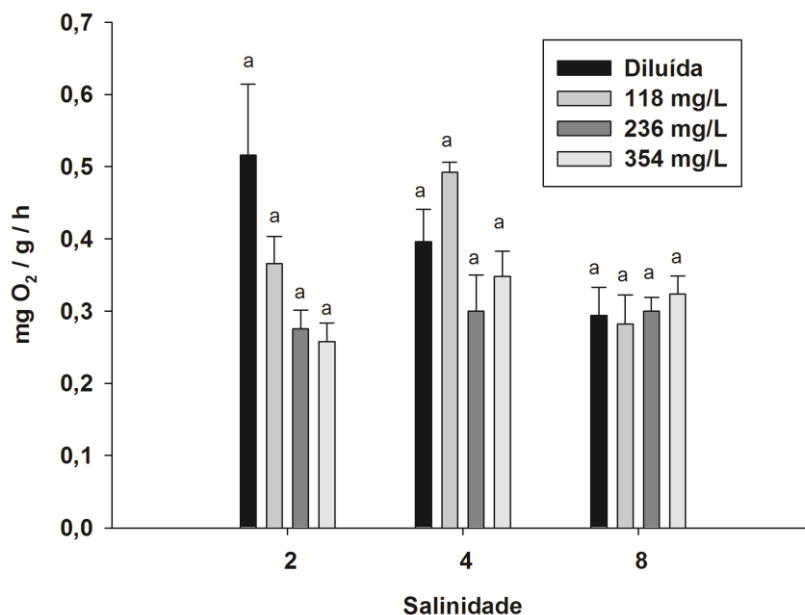


Figura 2. Consumo de oxigênio por *Litopenaeus vannamei* nas salinidades 2, 4 e 8 e nas concentrações de cálcio: diluída (água do mar diluída sem adição de cálcio), 118, 235 e 354 mg/L. Taxa de respiração expressa em mg O₂/g/h. Linhas verticais acima das barras denotam o erro padrão.

A osmolalidade da hemolinfa (figura 3) não variou entre as salinidades, uma tendência à maiores valores de osmolaridade nas maiores concentrações de cálcio pode ser notada (figura 3), entretanto, não ocorreram diferenças significativas para a osmolalidade entre salinidade ou concentração de cálcio ($p > 0,05$). Mean osmolality for salinity 2, 4 and 8 was

628±25, 629±17.1 and 656±15.4 mOsm.

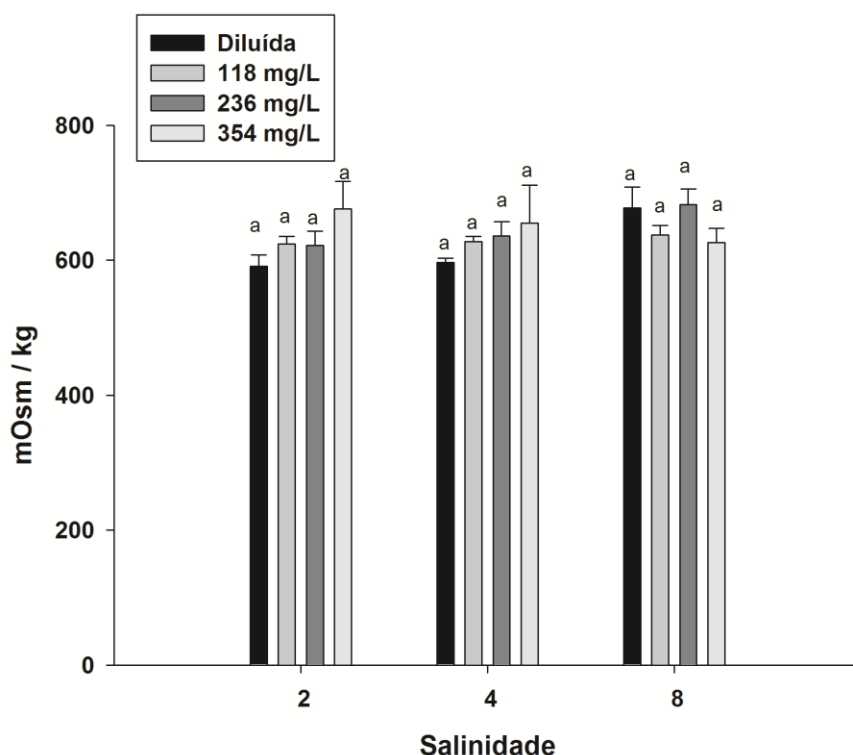


Figura 3. Osmolalidade (mOsm kg^{-1}) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* nas salinidades 2, 4 e 8 e nas concentrações de cálcio: diluída (água do mar diluída sem adição de cálcio), 118, 235 e 354 mg/L. Linhas verticais acima das barras denotam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

A atividade da Na^+/K^+ ATPase (figura 4) foi influenciada pela salinidade ($p < 0,05$) com os maiores valores encontrados na salinidade 2 (média $117,7 \pm 10$ mmol ADP mg /proteína /hora). Nenhum efeito significativo foi encontrado para concentração de cálcio ou para interação entre concentração de cálcio e salinidade. Nos tratamentos sem adição de cálcio ocorreu uma tendência à diminuição dos valores com o aumento na salinidade. Nos tratamentos com adição de cálcio ocorreu aumento na atividade nas salinidades 2 e 8 e diminuição na salinidade 4 com relação ao tratamento com água diluída.

Results for Na^+/K^+ -ATPase activity are shown in figure 4. The lowest value (12 mmoles ADP / mg protein / h) was seen in the gills of shrimps exposed to salinity 4ppt and 118mg/L of calcium concentration. The higher value (140 mmoles ADP / mg protein / h) was found at salinity 2ppt and 236mg/L of calcium concentration. Average activity (\pm standard error) for salinities 2, 4 and 8ppt were 110.7 ± 9.5 , 40.5 ± 11 and 79 ± 14 mmoles ADP / mg protein / h, respectively.

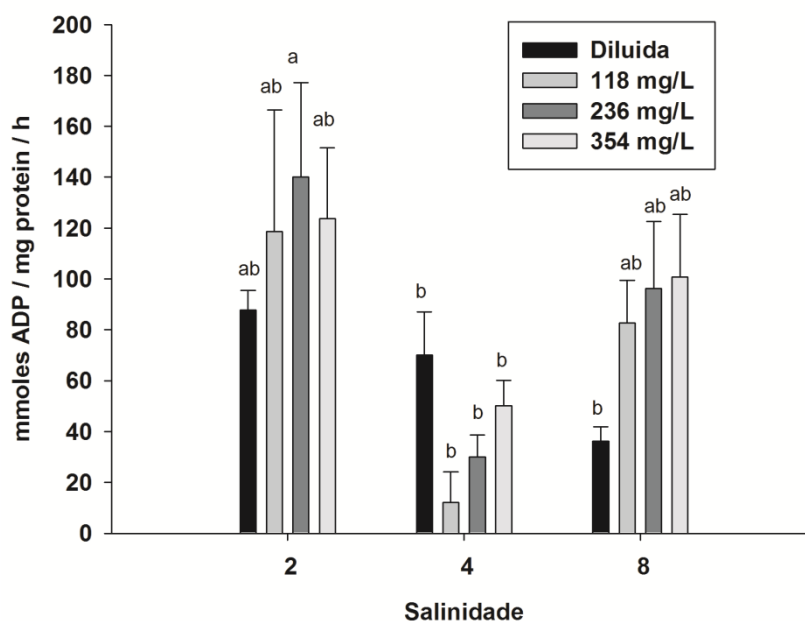


Figura 4. Atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias de *Litopenaeus vannamei* nas salinidades 2, 4 e 8 e nas concentrações de cálcio: diluída (água do mar diluída sem adição de cálcio), 118, 235 e 354 mg/L. Linhas verticais acima das barras denotam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Discussão

Em camarões peneídeos, o consumo de oxigênio tende a aumentar com a diminuição da salinidade (Kutty *et al.* 1971, Chen & Lai 1993, Chen & Chen 1997). O aumento na taxa de respiração em baixa salinidade pode indicar o aumento no consumo energético para a manutenção da homeostase iônica através de mecanismos ativos de iono/osmorregulação. Com mais energia sendo utilizada por esses mecanismos, menos energia acaba disponível para o crescimento. No presente trabalho, nos tratamentos sem adição de cálcio, os organismos consumiram mais oxigênio com a diminuição da salinidade. Nos tratamentos em que foram adicionados cálcio, na salinidade 2 e 4, as taxas de respiração foram menores do que os tratamentos sem adição do cátion indicando que a adição de cálcio pode ser benéfica nestas condições. Na salinidade 8, este efeito não foi observado, talvez porque a concentração de cálcio na água diluída desta salinidade esteja mais próxima a concentração dos tratamentos com adição de cálcio.

O aumento na excreção de amônia com a diminuição da salinidade foi relatado para *Penaeus japonicus* (Chen & Lai 1993) e para *Penaeus chinensis* (Chen & Lin 1995). Os mecanismos de excreção de TAN em crustáceos são: fluxo passivo de amônia (Kormanik & Cameron 1981), efluxo de amônio (Maetz & Garcia-Romen 1964) e a troca dos íons amônio por K^+ na Na^+/K^+ ATPase (Garçon *et al.* 2007). A maior excreção de TAN na salinidade 2 pode ser explicada pelo aumento no metabolismo de aminoácidos, Chen *et al.* (1998) relatam que, em baixa salinidade, camarões utilizam proteína como fonte preferencial de energia, o que resulta no aumento da excreção de TAN. Ademais, é sabido que em salinidade baixa, a taxa metabólica dos organismos aumenta devido à energia requerida para bombear os íons perdidos para o meio externo (Chen & Lai 1993) corroborando para aumento na excreção de TAN. Outro mecanismo utilizado para manter o balanço iônico, que também contribui para o

aumento da excreção observado, é a substituição dos cátions K^+ e Na^+ por NH_4^+ na urina (Spaargaren *et al.* 1982).

A pequena variação na pressão osmótica entre os tratamentos com diferentes salinidades está de acordo com o encontrado em estudos anteriores no qual *L. vannamei* é apontado como forte osmorregulador (Castille & Lawrence 1981, Rodriguez 1981; Charmantier *et al.* 1994, Rosas *et al.* 2002, Gong *et al.* 2004). Assim como para salinidade, nenhuma diferença foi encontrada para a osmolalidade entre as diferentes concentrações de cálcio testadas.

A atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase foi influenciada pela salinidade, mas não sofreu efeito da concentração de cálcio. Estudos demonstram o aumento da atividade da enzima com a diminuição da salinidade para repor os íons perdidos para o meio externo em ambiente hiposmótico (Hurtado *et al.* 2007). A atividade da enzima também é influenciada pelo estágio de muda do camarão. A bomba funciona gerando um gradiente de sódio para o transporte secundário de cálcio durante os estágios de pré-muda e pós-muda, atuando diretamente no aporte de cálcio para a recalcificação do exoesqueleto. Devido ao curto período de exposição deste experimento e ao estágio de muda (intermuda) utilizado para retirada das brânquias, o efeito da concentração de cálcio na água sobre a enzima Na^+/K^+ ATPase pode estar subestimado.

Resumindo, a menor taxa de excreção de TAN e o menor consumo de oxigênio na salinidade 2 nos tratamentos com adição de cálcio sugerem que a adição de cálcio pode ser benéfica a *L. vannamei* em baixas salinidades. Os dados de Na^+/K^+ ATPase revelaram maior atividade na salinidade 2, mas foram inconclusivos para a concentração de cálcio. Em futuros

estudos, os estágios de pré e pós-muda devem ser escolhidos para avaliar um possível o efeito da concentração de cálcio da água na atividade dessa enzima.

Literatura Citada

ALLAN EL, FRONEMAN PW, HODGSON AN. 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 337:103–108.

BIANCHINI A, CASTILHO PC. 1999. Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺, K⁺-ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). B. Environ. Contam. Tox. 62:63–69.

CASTILLE FL, LAWRENCE AL. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol. A 68:75–80.

Charmantier G, Soyez C, Aquacop. 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178:233–246.

CHEN JC, LAI SH. 1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and NH₃ -N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 165:161–170.

CHEN JC, NAN FH. 1994. Comparisons of oxygen consumption and ammonia-N excretion of five penaeids. J. Crust. Biol. 14:289–294.

CHEN JC, CHIN YL. 1995 Responses of Oxygen Consumption, Ammonia-N Excretion and Urea-N Excretion of *Penaeus chinensis* Exposed to Ambient Ammonia at Different Salinity and pH Levels. *Aquaculture*. 136(95):243–255

CHEN JC, CHEN KW. 1996. Hemolymph oxyhemocyanin, protein levels, acid-base balance, and ammonia and urea excretions of *Penaeus japonicus* exposed to saponin at different salinity levels. *Aquatic Toxicol.* 36:115-128.

CHEN JC, CHEN KW. 1997. Oxygen Uptake and Ammonia-N Excretion of Juvenile *Penaeus japonicus* during depuration following one day one day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels. *Aquaculture* 156:77–83.

GONG H, JIANG DH, LIGHTNER DV, COLLINS C, BROCK D. 2004. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquac. Nutr.* 10:227–236.

GRASSHOFF K, EHRHARDT M, KREMLING K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*, second ed. Verlag Chemie, Weinheim, 419 pp.

HURTADO MA, RACOTTA IS, CIVERA R, IBARRA L, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ M, PALACIOS E. 2007. Effect of Hypo- and Hypersaline Conditions on Osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase Activity in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed Low- and High-HUFA Diets. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147(3):703–10. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.002.

KORMANIK GA, & CAMERON JN. 1981. Ammonia excretion in animals that breathe water: a review. *Mar. Biol. Lett.* 2:11-23.

KUTTY MN, MURUGAPOOPATHY G, KRISHNAN TS. 1971. Influence of salinity and temperature on the oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. Mar. Biol. 11:125-131.

MAETZ J & GARCIA-ROMEN F. 1964. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish, *Carassius auratus*. II. Evidence for $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchange. J. Gen. Physiol. 47:1209-1227.

MORRIS S, & EDWARDS T. 1995. Control of Osmoregulation via Regulation of Na^+/K^+ - ATPase Activity in the Amphibious Purple Shore Crab *Leptograpsus variegates*. Comp Biochem Physiol A 112(2):129–136.

NEUFELD GJ, HOLLIDAY CW, PRITCHARD JB. 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211:215–224.

NEUFELD DS & CAMERON JN. 1993. Transepithelial Movement of Calcium in Crustaceans. J. Exp. Biol. 184:1–16.

PEQUEUX A & GILLES R. 1981. Na^+ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Exp. Biol. 92:173-186.

RODRIGUEZ GA. 1981. Osmoregulation and total serum protein of two species of Penaeid shrimps from the Pacific coast of Mexico. J. Crustac. Biol. 1:392–400.

ROSAS C, CUZON G, GAXIOLA G, PASCUAL C, TOBOADA G, ARENA L, VAN WORMHOUDT A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268:47–67.

ROY LA, DAVIS AD, SAOUD PI, HENRY RP. 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 147:404–411.

SPAARGAREN DH, RICHARD P, CECCALDI HJ. 1982. Excretion of nitrogenous products by *Penaeus japonicus* Bate in relation to environmental osmotic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 72A:673–678.

TOWLE DW. 1981. Transport related ATPase as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. *JExpZool*218:89–95

TOWLE DW, MANGUM CP. 1985 Ionic regulation and transport ATPase activities during the molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J.CrustBiol.* 5:216–222.

CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO I

Neste capítulo foi apresentado o resultado do estudo da combinação de 3 níveis de salinidade e 3 níveis de alcalinidade no crescimento e sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema BFT. O estudo demonstrou que a espécie é bastante resiliente a diferentes salinidades e diferentes concentrações de cálcio, obtendo resultados de crescimento e sobrevivência semelhantes quando os níveis de amônia e nitrito estão baixos. O estudo demonstrou, também, que quando cultivado em salinidade baixa é mais prudente se utilizar de água com pH mais baixo, diminuindo assim a concentração do gás amônia (mais tóxico que o íon amônio). Outro desafio encontrado para o cultivo em salinidade baixa são os picos de nitrito que usualmente acontecem em sistemas que não possuem uma comunidade de bactérias nitrificantes bem estabelecida. Assim, seria interessante que novos estudos focassem no desenvolvimento precoce dessas bactérias com o objetivo de se evitar concentrações elevadas de nitrito.

CAPÍTULO II

Neste capítulo foram testados os efeitos da adição de cálcio na água de cultivo com salinidades 2, 4 e 8 no crescimento e sobrevivência de *L. vannamei*. Com base nos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que a adição de cálcio melhora o ganho em peso dos camarões cultivados em baixa salinidade, principalmente em salinidades iguais ou inferiores a 4. Os motivos dessa melhora podem estar associados ao menor gasto energético ocasionado pela adição do cálcio na água de cultivo. O cálcio quando disponível em quantidade suficiente na água pode diminuir o gasto energético dos camarões de duas maneiras: diminuindo a

permeabilidade das membranas e impedindo a perda de íons do camarão para o ambiente hipo-osmótico e diminuindo a necessidade de transporte ativo de cálcio para repor o cálcio perdido durante a ecdise. Assim, sugerimos a suplementação de cálcio em águas com salinidade inferior a 4 e com concentração de cálcio menor ou igual a 118 mg/L.

CAPÍTULO III

Neste capítulo foram testados os efeitos da adição de cálcio na água de cultivo com salinidades 2, 4 e 8 na excreção, respiração e atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias de *L. vannamei*. Neste experimento observamos que a adição de cálcio no meio experimental diminui a excreção de amônia e a respiração de *L. vannamei* na salinidade 2, indicando que a adição de cálcio pode diminuir o gasto energético com a osmorregulação podendo propiciar maior energia para outros fins como o crescimento. A osmolalidade da hemolinfa não variou com a salinidade nem com a concentração de cálcio corroborando com dados de outros estudos que mostram a grande capacidade de osmorregulação da espécie. A atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase foi maior na salinidade 2 indicando maior gasto para osmorregulação nesta salinidade, entretanto nenhum efeito significativo da adição de cálcio foi observado na atividade da enzima.

REFERÊNCIAS

- ARANEDA M, PEREZ E, GASCALEYVA E. 2008. White Shrimp *Penaeus vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight. *Aquaculture* 283(1–4):13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.030.
- ATWOOD, HL, YOUNG SP, & TOMASSO JR. 2003. Survival and Growth of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae in Low-Salinity and Mixed-Salt Environments. *J. World Aquacult. Soc.* 34(4):518-523.
- AVNIMELECH, Y. 2006. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquac. Res.* 34:172–178
- BOYD, CE. & CLAY JW. 1998. Shrimp Aquaculture and the Environment. *Sci. Am.* 278(6):58-65.
- BOYD CE, TUCKER CS. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- BRICKER, SB, FERREIRA JG, SIMAS T. 2003. An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status. *Ecol. Model.* 169:39–60.
- BROCKINGTON, D, IGOE J, SCHMIDT-SOLTAU K. 2006. Conservation, human rights, and poverty reduction. *Conserv. Biol.* 20(1):250–252.
- EBELING, J, TIMMONS M, BISOGNI 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.

FISHER TR, BREEZE G, BOYNTON WR, WILLIAMS MR. 2006. Cultural eutrophication in the Choptank and Patuxent estuaries of Chesapeake Bay. *Agriculture*, 51: 435-447.

KAUTSKY, N, RONNBACK P, TEDENGREN M, TROELL M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145–161.

LACERDA L, VAISMAN A, MAIA L, RAMOSESILVA C, SOARESCUNHA E. 2006. Relative importance of nitrogen and phosphorus emissions from shrimp farming and other anthropogenic sources for six estuaries along the NE Brazilian coast. *Aquaculture*. 253:433-446.

LARAMORE S, LARAMORE CR, SCARPA J. 2001. Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 32(4):385–392. doi:10.1111/j.1749-7345.2001.tb00464.x.

LIGHTNER, DV. 1999. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods and Management Strategies. *J. App. Aqua* 9:27-52.

MCGRAW, WJ, DAVIS DA, TEICHERT-CODDINGTON D, ROUSE DB. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity, endpoint and rate of salinity reduction. *J. World Aquac. Soc.* 33:78–84

NIXON SW. 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41:199–219.

NIXON SW, AMMERMAN JW, ATKINSON LP, BEROUNSKY TM, BILLEN G, BOICOURT WC, BOYTON WR. 1996. The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry*. 35:141-180.

SAMOCHA TM, LAWRENCE AL, POOSER D. 1998. Growth and survival of juvenile *Penaeus vannamei* in low salinity water in a semi-closed recirculating system. *Isr. J. Aquac.* 50: 55–59

SAOUD IP, ALLEN DAVIS D, DAVID BR. 2003. Suitability Studies of Inland Well Waters for *Litopenaeus vannamei* Culture. *Aquaculture* 217:373–383.

SCHWAB BM & LEHMANN B. 2003. Key Management Challenges for the Development and Growth of a Shrimp Farm in Northeast Brazil: A Case Study of Camanor Produtos Marinhos Ltda. Report prepared under the World Bank, NACA

SENA SS, THUY TTN, NIGEL WA, UPALI SA. 2006. An evaluation of the role and impacts of alien finfish in Asian inland aquaculture. *Aquac. Res.* 37:1-17.

SOWERS AD, GATLIN DM, YOUNG SP, ISELY JJ, BROWDY CL, TOMASSO JR. 2005. Responses of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in Water Containing Low Concentrations of Total Dissolved Solids. *Aquac. Res.* 36(8):819–823. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01270.x.

TAPPIN AD. 2002. An examination of the fluxes of nitrogen and phosphorus in temperate and tropical estuaries: current estimates and uncertainties. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55:885–901.

THOMAN ES, INGALL ED, DAVIS AD, ARNOLD RC. 2001. A nitrogen budget for a closed, recirculating mariculture system. *Aquac. Eng.* 24:195–211.

WILKIE D, MORELLI GA, DEMMER J, STARKEY M, TELFER P, STEIL M. 2006. Parks and people: assessing the human welfare effects of establishing protected areas for biodiversity conservation. *Conserv. Biol.* 20(1): 247–249.

ANEXO 1.

Artigo submetido a revista Journal of the World Aquaculture Society.

Influence of Salinity and Alkalinity on Nursery and Early Grow-out Phase of Litopenaeus
vannamei Reared in a BFT System.

Kassio Rios da Silva

Post Graduate Student of Biological Oceanography, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG. Av. Itália, km 08, Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil, 96201-900

Plínio Furtado

Post Graduate Student of Aquaculture. Institute of Oceanography. Federal University of Rio Grande – FURG. Av. Itália, km 08. Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil. 96201-900. Phone +55 53 3236 8131.

Wilson Wasielesky Junior

Aquaculture and Marine Biotechnology Group. Institute of Oceanography. Federal University of Rio Grande – FURG. Av. Itália, km 08. Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil. 96201-900. Phone +55 53 3233 6509; Fax: +55 53 3233 6601.

Corresponding author: Aquaculture and Marine Biotechnology Group. Institute of Oceanography. Federal University of Rio Grande – FURG. Av. Itália, km 08. Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil. 96201-900. Phone +55 53 3236 8042; Fax: +55 53 3233 6601. E-mail: manow@mikrus.com.br

Abstract

The objective of the current work was to evaluate the effects of salinity and alkalinity on the zootechnical performance of Litopenaeus vannamei. The study was carried out in two phases: a nursery stage, in which shrimp were stocked for 28 days at a stocking density of one shrimp/L, and a grow-out phase, in which shrimp were stocked from the nursery stage at a lower density (0.3 shrimp/L) for 21 days. The salinities tested were 2, 12 and 24 ppt and the alkalinities were 50, 125 and 200 mg/L. During the nursery phase there was a mass mortality in the treatment that had a salinity of 2 ppt and an alkalinity of 200 mg/L. This mortality event was due to ammonia and nitrite build up combined with higher pH values. The other treatments produced no significant differences between the final biomasses, indicating that shrimp can be reared at salinities of 2 to 24 ppt with similar results. During the grow-out phase, higher survival and final biomasses were recorded in the salinities 12 and 24 ppt. In summary, producing shrimp at higher salinities is safer, but the same results can be achieved at lower salinities if ammonia and nitrite are kept under control.

Litopenaeus vannamei is a tropical species that has been successfully reared using diverse management systems around the globe. In the last decade, due to biosafety concerns and elevated land prices near coastal areas, L. vannamei has become an attractive species for inland farming due to its zootechnical performance in low salinity waters (Araneda et al. 2008; Maicá et al. 2012; Roy et al. 2010; Sowers et al. 2005).

There is no consensus on the ideal salinity for rearing L. vannamei. Studies suggest that the shrimp can tolerate and grow in a wide range of salinities (Araneda et al. 2008, Maicá et al. 2012). Inland low-salinity farming can bring benefits, such as biosecurity and reduced land prices. However, higher salinities have been shown to have a protective effect against nitrite and ammonia toxicity (Lin and Chen 2001, 2003).

According to Boyd and Tucker (1998), alkalinity levels of 75 mg/L (as CaCO₃) or higher are required to buffer water pH within a reasonable range for traditional cultivation of L. vannamei. In biofloc systems (BFT), the C:N ratio is increased by adding a carbon source that promotes the assimilation of nitrogen (mainly ammonium) by heterotrophic bacteria. The formation of bioflocs also stimulates the proliferation of nitrifying bacteria, as most of the inorganic nitrogen is converted to nitrate (Silva et al. 2013). In other words, the BFT system relies on hetero/lithotrophic nitrogen removal rather than phytoplankton uptake. Our hypothesis was that the system could be run at lower alkalinities because pH fluctuations tend to be minimal without phytoplankton CO₂ uptake. Thus, the objective of the current work was to evaluate the combined effects of salinity and alkalinity during nursery and early grow-out stages of L. vannamei reared in a BFT system.

Material and Methods

Shrimp and Experimental Design

The experiment was conducted at the Marine Station of Aquaculture (EMA/FURG), Federal University of Rio Grande - FURG. The experimental units were 27 circular fiberglass tanks (210 L total volume and 0.5 m² of bottom area) that had no water exchange. Litopenaeus vannamei nauplii were acquired from a commercial laboratory (Aquatec, Canguaretama, RN, Brazil) and kept in the larviculture sector of EMA (28.1 °C and 30 ppt) until they reached a mean weight of 0.2 g. Experimental salinities were created by mixing seawater and dechlorinated tap water gradually over a period of 10 days to achieve the desired concentrations. Alkalinity levels were adjusted by adding calcium hydroxide and hydrochloric acid. The water temperature was maintained using electric heaters.

The study was carried out in two phases: a nursery stage, where shrimp (0.22 ± 0.04 g) were stocked for 28 days at a density of one shrimp/L and a grow out phase, where shrimp were stocked from the nursery stage at a lower density (0.3 shrimp/L) for 21 days. A completely randomized, two factorial experiment was performed in 27 fiberglass tanks (150 L each). The salinities tested were 2, 12, and 24 ppt and the alkalinities tested were 50, 125, and 200 mg/L as CaCO₃. Shrimp were fed twice a day with commercial food containing 40% crude protein and 8% lipids during the nursery phase and 38% protein and 8% lipids during the grow-out phase. The food was provided in feeding trays, and the quantities were based on feeding rates proposed in Jory et al. (2001) and adjusted according to observed consumption.

Shrimp Performance

Every seven days, 50 shrimps (nursery phase) or 15 shrimps (grow-out phase) were randomly sampled from each tank and individually weighed to the nearest 0.01 g. After weighing, shrimp were returned to their respective tanks. At the end of the experiments,

shrimp were counted and individually weighed to provide estimates of survival, final weight, weight gain, specific growth rate (SGR), and total biomass. Apparent feed conversion rate (FCR) was estimated as the total dry weight of food offered per tank divided by the total shrimp wet weight gained at the end of the experiment.

Physical and Chemical Variables

Temperature, dissolved oxygen (DO), pH, salinity (YSI 556 MPS Multiprobe, Yellow Spring Instrument, Yellow Spring, OH, USA), and total ammonium nitrogen (TAN) (UNESCO 1983) were measured daily. Alkalinity (APHA 1998) and nitrite (Strickland and Parsons 1973) were determined every other day. Nitrate (Strickland and Parsons 1973), total suspended solids (TSS) (Strickland and Parsons 1973), and floc volume (FV) (Eaton et al. 1995) were determined once a week.

Statistical Analyses

Significant differences in shrimp performance parameters as well as physical and chemical variables were determined using factorial analysis of variance. A Tukey's Honest Significant Difference test was applied when significant differences were detected. Survival data were transformed ($\arcsin x^{-0.5}$) to resemble a normal distribution.

Results

Nursery Phase

The average experimental water temperature was $28 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (mean \pm SE) and the DO concentration ranged between 3.4 and 8 mg/L. Temperature and DO values were not significantly different among treatments ($p > 0.05$). The measured pH values were greater at the two higher alkalinities (Alk125 and Alk200) and lower at the reduced alkalinity level

(Alk50), with no significant effect observed due to salinity. The mean values for physical, chemical and biological variables are shown in Table 1. TAN concentrations did not vary significantly among the treatments, even though a marginally significant effect was observed for alkalinity ($p=0.06$). TAN concentrations (mean \pm SE) for alk50, alk125 and alk200 were: 2.9 ± 0.36 , 2.11 ± 0.28 , and 1.82 ± 0.32 mg/L, respectively. A significant effect of salinity on nitrite levels was observed ($p<0.05$). Nitrite concentrations were higher at sal12 and sal24, with average (\pm SE) concentrations at sal2, sal12 and sal24 of 5.5 ± 1 , 9.44 ± 1.14 , and 10.83 ± 1.3 mg/L, respectively.

Shrimp performance parameters are shown in table 2. One of the Sal2-Alk200 replicates had complete mortality of shrimps. Survival was greatest at higher salinities (24 and 12 ppt), but this effect was not significant for salinity, alkalinity or their interaction ($p>0.05$). Lowest shrimp weight gain was found in treatments Sal2-Alk50 (0.82 ± 0.09 g) and Sal12-Alk50 (1.1 ± 0.06) and the highest values were found in treatments Sal12-Alk125 (1.35 ± 0.09 g) and Sal12-Alk200 (1.38 ± 0.11 g). As observed for weight gain, the best FCRs were found in treatments Sal12-Alk125 and Sal12-Alk200, and the worst FCR and SGR was found in treatment Sal2-Alk50 ($p<0.05$).

Grow-Out Phase

Mean temperature and DO concentration were $27.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and 6.5 ± 0.1 mg/L, respectively. DO values ranged between 4.82 and 8.2 mg/L. Measured pH values showed the same pattern observed in the nursery phase, with higher values in Alk200 treatments. Mean values for chemical and physical variables are shown in table 3. TAN concentrations were higher in Alk50 treatments and lower in Alk200 treatments ($p<0.05$), with no significant effect of salinity observed. Mean (\pm SE) values for TAN at Alk50, Alk125, and Alk200 were

0.60 ± 0.07 , 0.33 ± 0.03 , and 0.25 ± 0.04 mg/L, respectively. Nitrite concentrations were higher in Alk-200 treatments and lower in Sal12 treatments. Mean nitrite concentrations pooled for Alk50, Alk125, and Alk200 were 2.86 ± 0.4 , 2.70 ± 0.37 , and 5.00 ± 0.6 , respectively.

Shrimp performance parameters are shown in table 4. The lowest survival was observed at Sal2-Alk125 (45%) and Sal2-Alk200 (66%). The greatest survival was found in Sal24 treatments, with 100% survival in all replicates. The highest SGR and weight-gain values were found in the treatments Sal2-Alk50, Sal2-Alk125, Sal2-Alk200, and Sal24-Alk125. Final weight was highest in the Sal24-Alk125 treatment and lowest in the Sal12-Alk50 treatment, but no significant difference was found for the final weight in the remaining treatments.

Discussion

Temperature was within the recommended range for optimal growth of Litopenaeus vannamei (Van Wyk and Scarpa 1999). Mean DO concentrations were above 5 mg/L during most of the experiment, although we recorded DO concentrations as low as 3 mg/L during the nursery phase due to higher molasses inputs that were added to counteract elevated TAN concentrations. Despite some episodes of suboptimal DO, we believe that this fact was of lesser importance in explaining the observed survival and growth. Mean pH values ranged between 7.40 and 8.27, and although these values were suitable for shrimp growth and survival (Van Wyk and Scarpa 1999), when higher pH values were combined with high alkalinity and low salinity, shrimp were predisposed to higher ammonia and nitrite toxicity and higher mortalities, as observed for treatment Sal2Alk200.

In a closed culture system, accumulation of nitrogen compounds, especially ammonia and nitrite, have detrimental effects on shrimp growth and survival. Studies have reported the toxicity of ammonia and nitrite and the protective effect of salinity (Lin and Chen 2001; Lin and Chen 2003; Schuler et al. 2010). During the nursery phase, TAN concentrations peaked at day 10, with mean values as high as 10.5 mg/L. Nitrite concentrations reached harmful levels after 10 days. Maximum nitrite concentrations for Sal2 were recorded in treatment Sal2Alk125 (30 mg/L), followed by Sal2Alk50 (21.4 mg/L), and Sal2Alk200 (13.2 mg/L). Despite the higher nitrite concentrations in Sal2Alk125 and Sal2Alk50, shrimp survival was satisfactory in these treatments. In treatment Sal2Alk200, however, two replicates had near total mortality. We believe that the mortalities observed for Sal2Alk200 were due to the combined effect of nitrite and ammonia. The higher pH values in this treatment shifted the ammonium \leftrightarrow ammonia equation to the right, which increased toxicity and mortality.

Sugar cane molasses addition was useful to counteract TAN peaks at day 10 in the nursery phase (data not shown). However, we were only able to increase the carbon input to the maximum level supported by our aeration system (i.e., sugar cane molasses was not added when DO concentrations were under 3 mg/L). TAN concentrations decreased after carbon addition, but increased again after several hours, therefore, requiring constant applications until TAN oxidation (nitrification) took place. Two days after TAN levels peaked, abrupt increases in nitrite concentrations were recorded. Carbon additions had no remarkable effect on nitrite concentrations, and because nitrite oxidizing bacteria (NOB) have long generation times, the shrimp were exposed to nitrite concentration above 10 mg/L for seven days.

At the end of the nursery phase (table 2), all treatments produced the same shrimp biomass (replicates with total mortality were not used in biomass calculation), indicating that apart from nitrite and ammonia toxicity, Litopenaeus vannamei can be reared in any of the

salinities and alkalinities tested if nitrite and ammonia build up counter measures were adopted.

In fact, ammonia and nitrite build up in the early stages of BFT shrimp production are a common issue (Maicá et al. 2012; Silva et al. 2013). Some strategies to keep nitrite levels under control include the reuse of post crop water containing a mature nitrifying biofloc community (Krummenauer *in press*) and inoculation of mature biofilm (Thompson et al. 2002; Schweitzer et al. 2013). If none of these strategies could be applied, low salinity shrimp culture in BFT should be avoided if there is no water available for emergency renewal.

Although there is no consensus for the ideal alkalinity, some authors (Van Wik and Scarpa 1999) suggest that ideal alkalinities are above 100 mg/L as CaCO₃ for traditional pond cultures. For shrimp reared in low salinity BFT systems, we suggest that alkalinity should be kept at lower values. In BFT systems, great diurnal variation in pH is not expected because light is usually a limiting factor for phytoplankton growth and heterotrophic metabolism is usually dominant. As a result, high alkalinity and pH in low salinity water may reduce yields because these conditions increase ammonia toxicity. This effect of pH (due to high alkalinity) was clearly observed during the grow-out phase, where the final biomass was highest in Sal12 and Sal24 and lowest in Sal2Alk125 and Sal2Alk200.

In summary, based on the current work we conclude that in salinities higher than 12 ppt, alkalinity had a minor effect on shrimp performance. Therefore, it is safer to produce shrimp at higher salinities, because ammonia and nitrite can build up quickly in BFT systems kept at low salinities. When using low salinity water it is necessary to utilize some strategy to avoid ammonia and nitrite build up. Ammonia can be easily mobilized by adding a carbon

source, but nitrite might demand more complicated strategies, such as inoculation of a mature biofloc, artificial substrates, or water renewal.

Literature Cited

- APHA, 1998.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American public health association, Washington, DC.
- Araneda, M., E. Perez, E. Gascaleyva.** White Shrimp *Penaeus Vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight. *Aquaculture* 283, no. 1–4 (October 2008): 13–18.
doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.030.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S.** 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Eaton, A.D., Cleserci, L.S., Greenberg, A.E.** (Eds.), 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 10th edition. Amer. Pub. Health Assoc., Washington D.C.
- Krummenauer, D, T.M. Samocha, L.H. Poersch, G. R. Lara, W. Wasielesky.** In Press. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in bft system. *Journal of the World Aquaculture Society*.
- Lin, Y.C., J.C. Chen.** 2011. Acute Toxicity of Ammonia on *Litopenaeus Vannamei* Boone Juveniles at Different Salinity Levels.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259(1):109–119.
- Lin, Y.C., J.C. Chen.** 2003. Acute Toxicity of Nitrite on *Litopenaeus Vannamei* (Boone) Juveniles at Different Salinity Levels. *Aquaculture* 224:193–201.
- Maicá, P. F., M. R.Borba., W. Wasielesky.** 2012. Effect of Low Salinity on Microbial Floc Composition and Performance of *Litopenaeus Vannamei* (Boone) Juveniles Reared in a Zero-water-exchange Super-intensive System. *Aquaculture Research* 43(3):361–370.
doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x.
- Roy, L. A., Davis, D A., Saoud, I. P. Saoud, C. A. Boyd, H. J. Pine, and C. E. Boyd.** 2010. Shrimp Culture in Inland Low Salinity Waters. *Reviews in Aquaculture* 2:191–208.
doi:10.1111/j.1753-5131.2010.01036.x.
- Schuler, D. J., G. D. Boardman, D. D. Kuhn, and G. J. Flick.** 2010. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Pacific White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*, at Low Salinities.

Journal of the World Aquaculture Society 41(3): 438–446. <http://blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.2010.00385.x>.

- Strickland, J. L. H. and T. R. Parsons.** 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada.
- Silva, K. R., W. Wasielesky, P. C. Abreu.** 2013. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 44(1):30-40.
- Schveitzer, R., R. Arantes, M. Francisco, P. Fóes, S. Costódio, L. Vinatea, W. Quadros, E. Roberto.** 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities : Effects on microbial activity , water quality and production rates. Aquacultural Engineering 54, 93–103.
- Sowers, A. D, D. M. Gatlin, S. P. Young, J. J. Isely, C. L. Browdy, J. R. Tomasso.** 2005. Responses of *Litopenaeus Vannamei* (Boone) in Water Containing Low Concentrations of Total Dissolved Solids. Aquaculture Research 36(8):819–823. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01270.x.
- Thompson, F. L., P.C. Abreu, and W. Wasielesky.** 2002. Importance of Biofilm for Water Quality and Nourishment in Intensive Shrimp Culture. Aquaculture 203:263–278.
- UNESCO** 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Pages 29–36 in Manual and guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.
- Van Wyk, P., J. Scarpa.** 1999. Water quality requirements and management. In: Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems (ed. by P.VanWyk), pp.128-138. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL, USA.

Tables

Table 1. Mean \pm standard error of salinity (ppt), alkalinity (mg/L as CaCO₃), pH, floc volume (FV; mL/L), total suspended solids (TSS; mg/L), total ammonium nitrogen (TAN; mg/L), nitrite (mg/L) and nitrate (mg/L) during the nursery phase of *Litopenaeus vannamei*. Different letters in the same column denote statistically significant differences ($p < 0.05$).

Treatment	Salinity	Alkalinity	pH	FV	TSS	TAN	Nitrite	Nitrate
Sal2 Alk50	2.57 \pm 0.03a	58.14 \pm 2.71a	7.46 \pm 0.04a	11 \pm 1a	370 \pm 29ab	2.82 \pm 0.68a	5.92 \pm 1.53acd	3.58 \pm 0.86
Sal2 Alk125	2.6 \pm 0.04a	127.11 \pm 3.14b	7.99 \pm 0.03b	17 \pm 2a	507 \pm 33a	2.55 \pm 0.50a	8.88 \pm 2.21abcd	2.49 \pm 1.62
Sal2-Alk200	2.6 \pm 0.11a	213.52 \pm 6.8c	8.27 \pm 0.03c	15.0	186 \pm 102b	2.05 \pm 0.63a	1.71 \pm 0.85cd	0.74 \pm 0.64
Sal12-Alk50	11.8 \pm 0.15b	55.37 \pm 2.34a	7.4 \pm 0.04af	20 \pm 7a	560 \pm 121a	2.89 \pm 0.55a	9.63 \pm 1.74abcd	4.79 \pm 1.11
Sal12-Alk125	11.8 \pm .14b	128.5 \pm 3.56b	7.78 \pm 0.04dg	22 \pm 3a	588 \pm 53a	2.40 \pm 0.50a	9.41 \pm 2.44abcd	5.30 \pm 1.34
Sal12-Alk200	12.08 \pm 0.14b	206.3 \pm 3.22c	7.98 \pm 0.02beh	24 \pm 4a	342 \pm 90ab	2.01 \pm 0.48a	9.29 \pm 1.79abcd	6.5 \pm 1.93
Sal24-Alk50	24.86 \pm 0.2c	57.04 \pm 2.05a	7.28 \pm 0.04f	18 \pm 1a	493 \pm 64a	2.98 \pm 0.66a	4.06 \pm 1.02d	5.91 \pm 3.36
Sal24-Alk125	25.35 \pm 0.26c	123.9 \pm 2.22b	7.66 \pm 0.03g	20 \pm 3a	642 \pm 31a	1.39 \pm 0.45a	12.61 \pm 2.08a	5.08 \pm 1.47
Sal24-Alk200	24.79 \pm 0.24c	210.22 \pm 3.54c	8.04 \pm 0.01hb	21 \pm 1a	355 \pm 134ab	1.43 \pm 0.57a	15.82 \pm 2.61b	13.83 \pm 1.29

Table 2. Mean \pm standard error of final weight (g), weight gain (g), specific growth rate (SGR; %/day), food conversion ratio (FCR), survival (%) and total biomass (g) measured at the end of the nursery phase. Different letters in the same column denote statistically significant differences ($p < 0.05$). *Data relating to one replicate. Two replicates with total mortalities were removed from the final weight, weight gain, SGR and FCR calculations.

Treatment	Final Weight	Weight Gain	SGR	FCR	Survival	Biomass
Sal2 Alk50	1.04 \pm 0.09a	0.82 \pm 0.09a	3.93 \pm 0.46a	1.59 \pm 0.05a	86.66 \pm 8.4a	154.85 \pm 31.1a
Sal2 Alk125	1.45 \pm 0.1b	1.23 \pm 0.1b	5.43 \pm 0.35ab	1.65 \pm 0.11a	94.89 \pm 2.48a	207.3 \pm 18.9a
Sal2-Alk200*	1.53 \pm 0.16b*	1.3 \pm 0.16b*	5.9 \pm 0.43ab*	1.5*	28.86	67*
Sal12-Alk50	1.32 \pm 0.06a	1.1 \pm 0.06a	5.4 \pm 0.22ab	1.83 \pm 0.08a	88.44 \pm 0.97a	159.3 \pm 18.1a
Sal12-Alk125	1.58 \pm 0.094bc	1.35 \pm 0.09bc	6 \pm 0.26b	1.44 \pm 0.06c	97.55 \pm 0.59a	230.6 \pm 9.02a
Sal12-Alk200	1.61 \pm 0.11bc	1.38 \pm 0.11bc	5.86 \pm 0.4b	1.45 \pm 0.01c	96.22 \pm 1.56a	232.75 \pm 19.6a
Sal24-Alk50	1.34 \pm 0.09b	1.12 \pm 0.09b	5.22 \pm 0.32ab	1.48 \pm 0.05c	97.77 \pm 1.35a	197.16 \pm 10.11a
Sal24-Alk125	1.41 \pm 0.08b	1.19 \pm 0.08b	5.55 \pm 0.27b	1.88 \pm 0.08a	99.33 \pm 0.67a	209.88 \pm 6.44a
Sal24-Alk200	1.38 \pm 0.1b	1.16 \pm 0.1b	5.27 \pm 0.33ab	1.4 \pm 0.04cc	98 \pm 0.67a	204.83 \pm 15a

Table 3. Mean \pm standard error of salinity (ppt), alkalinity (mg/L as CaCO₃), pH, floc volume (FV; mL/L), total suspended solids (TSS; mg/L), total ammonium nitrogen (TAN; mg/L), nitrite (mg/L) and nitrate (mg/L) during the grow-out phase of *Litopenaeus vannamei*. Different letters in the same column denote statistically significant differences ($p < 0.05$).

Treatment	Salinity	Alkalinity	pH	FV	TSS	TAN	Nitrite	Nitrate
Sal2 Alk50	2.9 \pm 0.06a	45 \pm 2.4a	7.48 \pm 0.03a	13 \pm 2a	316.7 \pm 63.3a	0.61 \pm 0.13a	2.4 \pm 0.65a	3.31 \pm 1.47a
Sal2 Alk125	3.1 \pm 0.06a	136 \pm 2.7b	8 \pm 0.02b	17 \pm 3a	373.3 \pm 55a	0.38 \pm 0.03ab	4.9 \pm 0.93ab	2.07 \pm 0.82a
Sal2-Alk200	3.2 \pm 0.12a	197 \pm 3.8c	8.16 \pm 0.02c	19 \pm 2a	283.3 \pm 54.19a	0.46 \pm 0.03ab	4.75 \pm 1.14ab	0.74 \pm 0.74a
Sal12-Alk50	12.6 \pm 0.21b	45.8 \pm 2.9a	7.2 \pm 0.07a	22 \pm 3a	475 \pm 42.52a	0.7 \pm 0.1a	2.12 \pm 0.85a	4.973 \pm 2.42ab
Sal12-Alk125	12.4 \pm 0.2b	136.2 \pm 2.9b	7.98 \pm 0.02b	26 \pm 2a	536.7 \pm 78.23a	0.33 \pm 0.1ab	1.22 \pm 0.21a	7.89 \pm 4abc
Sal12-Alk200	12.1 \pm 0.13b	213.7 \pm 3d	8.2 \pm 0.02c	21 \pm 3a	536.7 \pm 74.3a	0.16 \pm 0.02b	2.41 \pm 0.55a	13.33 \pm 0.7bc
Sal24-Alk50	24.2 \pm 0.3c	60.6 \pm 1.96e	7.55 \pm 0.03a	16 \pm 1a	260 \pm 49.33a	0.51 \pm 0.04 a	3.95 \pm 0.5a	4.27 \pm 1.73a
Sal24-Alk125	24.4 \pm 0.37c	135 \pm 2.5b	7.98 \pm 0.02b	17 \pm 3a	380 \pm 59.23a	0.3 \pm 0.03ab	2.03 \pm 0.36a	5.49 \pm 1.12a
Sal24-Alk200	24.8 \pm 0.12c	226 \pm 2.3d	8.19 \pm 0.01c	19 \pm 5a	561.7 \pm 162.23a	0.14 \pm 0.05b	7.88 \pm 1.03b	15.02 \pm 1.72c

Table 4. Mean \pm standard error of initial weight (g), final weight (g), weight gain (g), specific growth rate (SGR; %/day), food conversion ratio (FCR), survival (%) and total biomass (g) measured at the end of the grow out phase. Different letters in the same column denote statistically significant differences ($p < 0.05$).

Treatment	Initial Weight	Final Weight	Weight Gain	SGR	FCR	Survival	Biomass
Sal2 Alk50	1.38 \pm 0.015a	3.17 \pm 0.09a	1.8 \pm 0.09ab	3.74 \pm 0.16a	1.44 \pm 0.33ab	92 \pm 6.11ac	83.24 \pm 18.16bc
Sal2 Alk125	1.29 \pm 0.031a	3.08 \pm 0.14ac	1.79 \pm 0.13ab	3.88 \pm 0.21ab	2.08 \pm 0.11 ^a	45.33 \pm 5.82b	40.54 \pm 9.73a
Sal2-Alk200	1.14 \pm 0.017b	3.06 \pm 0.09ac	1.92 \pm 0.09a	4.53 \pm 0.15b	1.25 \pm 0.39b	66 \pm 18.58a	60.1 \pm 24.04ac
Sal12-Alk50	1.15 \pm 0.01b	2.67 \pm 0.07c	1.52 \pm 0.07b	3.73 \pm 0.13ab	1.47 \pm 0.27ab	94 \pm 6c	77.97 \pm 18bc
Sal12-Alk125	1.71 \pm 0.01c	3.22 \pm 0.09ab	1.5 \pm 0.09b	2.75 \pm 0.15c	1.55 \pm 0.26ab	82 \pm 14.19c	61.62 \pm 18.89bc
Sal12-Alk200	1.85 \pm 0.04e	3.44 \pm 0.08ab	1.6 \pm 0.08ab	2.88 \pm 0.13c	1.58 \pm 0.2ab	98 \pm 1.15c	77.78 \pm 8.49bc
Sal24-Alk50	1.56 \pm 0.02d	3.14 \pm 0.07a	1.58 \pm 0.07ab	3.19 \pm 0.11cd	1.2 \pm 0.09b	100c	92.53 \pm 3.95bc
Sal24-Alk125	1.67 \pm 0.02c	3.51 \pm 0.07b	1.84 \pm 0.07ab	3.44 \pm 0.1ad	1.06 \pm 0.14b	100c	112.38 \pm 10.52b
Sal24-Alk200	1.58 \pm 0.01d	3.2 \pm 0.07a	1.61 \pm 0.07ab	3.17 \pm 0.1cd	1.15 \pm 0.08b	100c	99.89 \pm 5.73bc

ANEXO 2.

Artigo submetido a revista: Journal of Experimental Biology and Ecology

Effects of waterborne calcium on growth and survival of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in low salinity water

Kassio Rios da Silva¹ and Wilson Wasielesky Jr².

1 Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brazil.

2- Corresponding author. Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel S/N. RS, Brazil. ZIP CODE 96210-030

E-mail: manow@mikrus.com.br Phone (55)5332368042

Abstract

The effect of different waterborne calcium concentration on survival and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was examined in the laboratory due to the interest of raising shrimp inland at low salinities. The experiment was conducted in 12 treatments (N = 4) with 3 different salinities (2, 4 and 8ppt) and 4 calcium levels (diluted seawater, 118, 236 and 354 mg/L). The shrimp (0.34 ± 0.1 g) were stocked in 5L aquaria for 21d and survival and growth were recorded at the end of the experiment. There was no significant difference for survival ($p > 0.05$). For weigh gain, there was no significant effect for salinity ($p > 0.05$) and interaction between salinity and calcium levels. Although, a significant difference between calcium levels ($p < 0.05$) was observed. A tendency of higher final weight in higher calcium concentrations was noticed, with higher weigh gain in treatment 354 mg/L (1 ± 0.06 g) followed by 236 mg/L (0.87 ± 0.04), 118 mg/L (0.82 ± 0.06) and diluted seawater (0.8 ± 0.05). It appears from this experiment that higher calcium concentration may enhance shrimp growth in low salinity and calcium supplementation may be a good choice for low salinity shrimp culture.

Keywords: salinity, shrimp, calcium, vannamei, low salinity.

1. Introduction

Inland culture of shrimp may be more economically viable than coastal culture in developed countries due to the high cost of land and environmental protection in coastal areas. The ability to tolerate a wide range of salinities has made *Litopenaeus vannamei* a popular species for low salinity culture. Given the euryhaline nature of this species, farmers and researchers have been focusing on culturing Pacific white shrimp in low-salinity (Maicá et al. 2012; McGraw et al. 2002) and mixed salt environments (Atwood et al. 2003; Sowers et al. 2006).

Calcium is an important element required for calcification in the hardening cuticle. In addition to this role, it helps to maintain physiological homeostasis and to decrease water and ionic permeability of cells. This control of permeability is of vital importance for the acclimation of estuarine organisms to low salinity water (Weil and Pantin, 1931). Marine decapods lose most of their body calcium during ecdysis and calcification of the new exoskeleton is achieved predominantly with calcium absorbed from seawater (Greenaway, 1985; Robertson, 1960). In seawater, uptake of calcium via the calcium channel in the apical membrane is passive down an electrochemical gradient. In the case of euryhaline crustaceans in a low salinity or freshwater environment, the large increase in net uptake of calcium is through active transport across the gill epithelium (Neufoeld and Cameron, 1993).

Despite the ability to tolerate a wide range of salinity *Litopenaeus vannamei* usually have inferior results in terms of survival and growth in fresh water and low salinity than in regular seawater (Araneda et al. 2008; Van Wyk et al. 1999). The objective of the current work was determinate if supplemental waterborne calcium can improve shrimp growth and survival in low salinity water.

2. Material and Methods

The experiment was conducted at the Marine Station of Aquaculture (EMA/FURG), Federal University of Rio Grande - FURG. The experiment had 12 treatments and two factors: salinity (2, 4 and 8) and calcium concentrations (diluted sea water, 118 mg/L, 236 mg/L and 354 mg/L) each treatment had 4 replicates. The experimental units were 48 aquaria (5 L total volume) randomly disposed within a controlled temperature water table (28 ± 1 °C). The calcium concentration levels were chosen to emulate the natural calcium concentration in salinities 10, 20 and 30ppt and verify if calcium addition has a beneficial effect in grow and survival of *L. vannamei*. Water level and salinity were monitored daily and maintained throughout the experiment by adding distilled water to avoid salinity changes due to evaporation. Experiment was performed under static conditions; salinity was checked daily and distilled water was added to compensate for evaporation losses. After salinity correction, feces and organic debris were siphoned out of the experimental units. A complete water renewal was performed every 3 days with previously standardized water.

Samples for total ammonia (UNESCO, 1983) and nitrite (Strickland and Parsons, 1973) determination were collect every 3 days before water renewal procedure. Temperature, dissolved oxygen (DO), pH and salinity were measured daily (YSI 556 MPS Multiprobe. Yellow Spring Instrument, Yellow Spring, OH, USA).

2.1 Water Preparation and Ca determination.

Experimental media were prepared using filtered (5- μ m mesh filter) saltwater at 30 ppt

collected at Cassino Beach (Rio Grande, RS, Southern Brazil). Water was diluted with distilled water to salinities 2, 4 and . Different calcium concentrations were obtained adding CaCl_2 to the experimental water. After calcium dissolution, the experimental media was gently aerated for 12 h and a sample was collected for calcium determination by atomic absorption flame photometry (MicroNal, SP, Brazil).

The post larvae were gradually acclimated to low salinity by adding limited amounts of freshwater to dilute the rearing water salinity by approximately 2–5 ppt daily. When salinity reached 10 it was reduced by 1 ppt/day to the experimental salinity concentration. After acclimation shrimp were weighed and stocked in experimental units.

All tanks were stocked with 2 shrimp/ L (0.34 ± 0.1 g mean weight \pm standard deviation). *Litopenaeus vannamei* nauplii were acquired from a commercial laboratory (Aquatec, Canguaretama, RN, Brazil) and kept in the larviculture sector of EMA until experimental use. Shrimp feed containing 38% crude protein (Poty Mar ©, São Paulo - Brazil) was used throughout the experiment. The daily feeding rate for the shrimp was 8% of shrimp biomass; feed was distributed twice a day at 0800 hr and 1900 hr.

2.2 Statistical Analyses

Significant differences in shrimp performance parameters as well as physical and chemical variables were determined using factorial ANOVA. A Tukey's Honest Significant Difference test was applied when significant differences were detected. Survival data were transformed ($\arcsin x^{-0.5}$) to resemble a normal distribution.

3. Results

The average experimental water temperature was $28 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (mean \pm SE), DO concentration ranged between 5.8 and 8 mg/L and pH values oscillated between 6.9 and 7.9. Temperature, DO and pH values were not significantly different among treatments ($p > 0.05$). TAN and nitrite concentration did not show significantly differences among treatments. The highest value of TAN (0.48mg/L) were recorded in salinity 4 ppt and diluted sea water .The highest value of nitrite (0.25mg/L) was found in salinity 8 ppt and 236mg/L calcium concentration.

The shrimp survival data are shown in table 1. Survival was greatest at salinity 8 and 354 mg/L calcium concentration and lower in salinity 2 diluted water, but this effect was not statistically significant for salinity, calcium concentration or their interaction ($p > 0.05$). The shrimp final weigh are show in figure 1. There was no significant effect of salinity and interaction between salinity and calcium levels on shrimp weigh gain ($p > 0.05$) but there was a significant effect between calcium levels ($p < 0.05$). Higher weigh gain was obtained in 354 mg/L of calcium concentration (1 ± 0.06 g) followed by 236 mg/L (0.87 ± 0.04), 118 mg/L (0.82 ± 0.06) and diluted water (0.8 ± 0.05). There was a tendency of higher final weight in higher calcium concentrations in salinities 2 and 4 ppt with significant difference between treatments with 354 mg/L of calcium concentration and diluted sea water. The same trend was not observed in salinity 8 where no significant difference in final weigh was observed within salinity 8 ($p > 0.05$)

Salinity		
2	4	8

Ca Concentration	<i>Survival</i>		
diluted sea water	91.6 ± 8.3	95.8 ± 4.2	91.6 ± 4.8
118 mg/L	95.8 ± 4.2	92.0 ± 4.0	95.8 ± 4.2
236 mg/L	92.0 ± 4.2	95.8 ± 4.2	91.6 ± 8.3
354 mg/L	87.0 ± 4.2	95.8 ± 4.2	95.8 ± 4.2
	<i>Biomass</i>		
diluted sea water	3.74 ± 1.2	4.75 ± 1.4	4.84 ± 0.9
118 mg/L	4.94 ± 1.1	4.50 ± 1.6	4.44 ± 0.7
236 mg/L	5.10 ± 0.7	5.20 ± 0.8	4.25 ± 0.7
354 mg/L	6.12 ± 0.7	5.80 ± 1.0	4.85 ± 1.7

Table 1. Survival (%) and final biomass (g) (mean ± standard error) of *Litopenaeus vannamei* after 21 days of experiment.

4. Discussion

Temperature, pH and DO were within the recommended range for optimal growth of *Litopenaeus vannamei* (Van Wyk and Scarpa, 1999). TAN and nitrite concentrations were kept under secure limits for the species (Lin and Chen, 2001; Lin and Chen, 2003). Except for salinity and calcium concentration no significant difference were found for chemical and physical variables between treatments.

In the last decades, studies have reported successful low salinity and even fresh water *L. vannamei* farming (Araneda et al. 2008; Van Wyk et al. 1999). Bray et al. (1994) found no difference in survival rates of 2g juveniles between 5 and 40 ppt. Samocha et al. (1998) found no difference in growth or survival of 2g juveniles between 2 and 8 ppt. Nevertheless, several works points a worst performance in salinity 2 and below. Maicá et al. (2012) found that shrimp had better growth and survival in salinity 25, 4 and 2ppt, respectively. Laramore et al. (2001) reported 0% survival in 0.1g post larvae after 18d of experiment in salinity 0, 0.5 and 1ppt and 40% and 60% survival for salinity 2 and 3ppt, respectively.

The consequences of marine crustaceans cultured at low salinities can often include delayed growth, which can be attributed to increased energetic demands to maintain relative osmotic hemolymph homeostasis via increased active ion transport (Ye et al. 2009). The most energetically costly ion transporter is Na⁺/K⁺- ATPase driven transport (Lucu and Towle, 2003), which generally increases when estuarine crustaceans are exposed to low salinities (Huong et al., 2010; Lucu et al., 2008; Piller et al., 1995; Torres et al., 2007). Increased energy expenditure for osmoregulation can subsequently lead to less energy available for shrimp growth. In the current work we did not find significant difference for growth and survival between tested salinities. Regarding to calcium concentration, at diluted saltwater treatments (no calcium addition) a trend of better growth at higher salinities was observed, although this effect was not statistically significant ($p > 0.05$). On the other hand, waterborne calcium augmentation had a remarkable effect in shrimp weight gain in salinity 2 and 4ppt where treatments with 354mg/L of calcium showed better weight gain compared to diluted saltwater ($p < 0.05$). This finding can be explained by less energy expenditure for active calcium uptake after ecdyses and for the calcium impermeability effect on membranes.

Active calcium transport have been suggested for *Austropotamobius pallipes* (Greenaway, 1974) and *Gammarus pulex* (Wright, 1979) when in water with low concentrations of calcium. In *Callinectes sapidus* acclimated to low salinity, it's proposed that active transport is responsible for the calcium movements (Neufeld and Cameron, 1992). Wurtz and Stickney (1989) related the effect of waterborne calcium in *Sciaenops ocellatus* grow and survival. The authors linked the high mortality and delayed growth in low calcium environment to the calcium mediated, passive permeability barrier to monovalent ions (sodium and potassium) at gill and body surfaces. High levels of calcium decrease passive

permeability preventing ions leakage in hypoosmotic environment thus reducing energy used for active ionoregulation.

In conclusion, *Litopenaeus vannamei* survives and grow in the range of salinity tested. Calcium addition to water improved shrimp growth at salinity 2 and 4 and had no effect in salinity 8. Calcium supplementation might be a good choice for low salinity shrimp culture with calcium concentrations lower than 118mg/L, especially in the early life stages when shrimp are more susceptible to lose ions to hypoosmotic media due to high surface / volume ratio (Ogawa, 1975) and calcium during frequent ecdises (Diwan, 2005).

5. Acknowledgements

The author would like to thank CAPES for the scholarship obtained during the realization of the current work and Indianara Barcarolli for the calcium analyses.

6. References

- Araneda, M., Perez, E., Gascaleyva, E. 2008. White Shrimp *Penaeus Vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight. *Aquaculture* 283(1–4): 13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.030
- Atwood, H. L., Young, S. P. and Tomasso, J. R. 2003. Survival and Growth of Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Postlarvae in Low-Salinity and Mixed-Salt Environments. *J. World Aquacult. Soc.* 34(4):518-523.

Bray, W. A., Lawrence, A. L. and Leung-Trujillo, J.R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122: 136-146.

Castille, F. L. and Lawrence, A. L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68:75-80.

Charmantier, G., Charmantier-Davies, M., Bouoricha, N., Thuet, P., Aiken, D. E. and Trilles, J. P. 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 175:102-110.

Chen, J. C., Lin, J., Chen, C. and Lin, M. 1996. Survival, growth and intermolt period of juvenile *Penaeus chinensis* (Osbeck) reared at different combinations of salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204:169-178.

Diwan, A.D. 2005. Current Progress in Shrimp Endocrinology - A Review. *Indian J Exp Biol.* 43:209–233.

Greenaway, P. 1974. Calcium balance at the postmoult stage of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). *J. exp. Biol.* 61:35–45.

Greenaway, P. 1985. Calcium Balance and Moulting in the Crustacea. *Biol. Rev.* 60(3):425–454. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1985.tb00424.x/pdf>.

Gunter, C. J. and Hildebrand. H. 1954. The relation of total rainfall of the state and catch of the marine shrimp (*Penaeus setiferus*) in Texas waters. *B Mar Sci (Gulf and Caribbean)* 4:95-103.

Gunter, C. J., Christmas, Y. and Killebrew, R. 1964. Some relations of salinity to population distributions of motile estuarine organisms, with special reference to penaeid shrimp.

Ecology 45:181- 185.

Herke, W. H., M. W. Wengert, and M. E. LaGory. 1987. Abundance of young brown shrimp in natural and semi-impounded marsh nursery areas: relation to temperature and salinity.

Northeast Gulf Science 9:9-28.

Huong DTT, Yang W-J, Okuno A, Wilder MN (2001) Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. Comp Biochem Physiol A 128:317–326

Jasmani, S., Vidya, J., Shinji, J. and Wilder, M. N. 2010. Carbonic Anhydrase and Na/K-ATPase Activities During the Molt Cycle of Low Salinity-reared White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. Fisheries Sci. 76(2):219–225. doi:10.1007/s12562-009-0202-1.

Kumlu, M. and Jones. D. A. 1995. Salinity tolerance of hatchery-reared postlarvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards originating from India. Aquaculture 130:287-296.

Laramore, S., Laramore, C. R. and Scarpa J. 2001. Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus Vannamei*. J World Aquacult Soc 32(4):385–392. doi:10.1111/j.1749-7345.2001.tb00464.x.

Lin, Y. C., and Chen J. C. 2001. Acute Toxicity of Ammonia on *Litopenaeus Vannamei* Boone Juveniles at Different Salinity Levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259(1):109–119.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325379>.

- Lin, Yong-chin, and Chen, Jiann-chu. 2003. Acute Toxicity of Nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles at Different Salinity Levels. *Aquaculture* 224:193–201.
doi:10.1016/S0044-8486(03)00220-5.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. Na⁺⁺K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 195–214.
- Lucu, Č., Pavičić, J., Ivanković, D., Pavičić-Hamer, D., Najdek, M., 2008. Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A, 362–372
- Maicá, P. F., Maude, R. B., and Wasielesky W. Jr. 2012. Effect of Low Salinity on Microbial Floc Composition and Performance of *Litopenaeus Vannamei* (Boone) juveniles Reared in a Zero Water Exchange Super Intensive System. *Aqua. Res.* 43(3):361-370.
doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x.
- Mair, J. McD. 1980. Salinity and water preferences of four species of postlarval shrimp (Penueus) from West Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45:69-82.
- McGraw, W.J., Scarpa, J., 2003. Minimum environmental potassium for survival of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in fresh water. *J. Shellfish Res.* 22:263-267.
- Neufeld D.S. and Cameron J.N. 1993 Transepithelial movement of calcium in crustaceans. *J Exp Biol* 184:1–16
- O'Brien, C. J. 1994. The effects of temperature and salinity on growth and survival of juvenile tiger prawns *Penueus esculentus* (Haswell). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 183: 133-145.

Ogawa, M., 1975. The effects of prolactin, cortisol and calcium-free environment on water influx in isolated gills of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52:539-543

Ogle, J. T., K. Beaugez, and J. M. Lotz. 1992. Effects of salinity on survival and growth of post-larval *Penaeus vannamei*. *Gulf Res. Rep.* 8:415-421.

Piller, S. C., Henry, P. D., Doeller, J. E. and Kraus, D. W. 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp. Biol.* 189:349–358.

Robertson, J. D. 1960. Ionic regulation in the crab *Carcinus maenas* in relation to the moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 1:183-212

Romano, N., and Zeng, C. 2012. Osmoregulation in Decapod Crustaceans: Implications to Aquaculture Productivity, Methods for Potential Improvement and Interactions with Elevated Ammonia Exposure. 2012. *Aquaculture* 334–337: 12–23.
doi:10.1016/j.aquaculture.2011.12.035.

Strickland, J. L. H. and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada

Torres, G., Charmantier-Daures, M., Chifflet, S., Anger, K., 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiology A* 147:460–465.

UNESCO 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Pages 29–36 in Manual and guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, C.R., Main, K.L., Mountain, J., Scarpa, J., 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. FDACS contract M520.

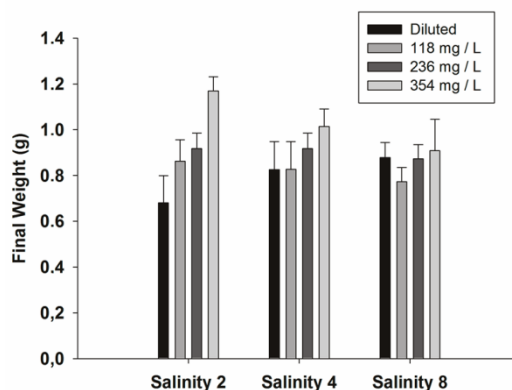
Weil, E. and Pantin, C. F. A. 1931. The adaptation of *Gunda ulvae* to salinity. II. The water exchange. J. exp. Bio. 8:73-81.

Wright, D. A. 1979. Calcium Regulation In Intermoult Gammarus Pulex. J. Exp. Biol. 83:131–144.

Wurts, W., and Stickney, R. R. 1989. Responses of Red Drum (*Sciaenops Ocellatus*) to Calcium and Magnesium Concentrations in Fresh and Salt Water. Aquaculture 76(1–2)21–35. doi:10.1016/0044-8486(89)90248-2.

Ye, L., Jiang, S., Zhu, X., Yang, Q., Wen, W., Wu, K., 2009. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 290, 140–144.

Figure 1. Shrimp final weight (g) at salinities and calcium concentrations tested (diluted stands for diluted salt water with no calcium addition). Error bars denotes standard error. Different letters indicates significant difference ($p < 0.05$)



ANEXO 3.

Artigo submetido a Journal of Experimental Zoology part A

Na⁺ / K⁺-ATPase activity, respiration and ammonia excretion in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to low salinities and different calcium concentrations.

Authours: Kassio Rios da Silva¹, Plínio Furtado², Adalto Bianchini³, Marianna Basso Jorge³ and Wilson Wasielesky Jr*.

- 1- Post Graduate Student of Biological Oceanography, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG. Av. Itália, km 08, Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil, 96201-900
- 2- Post Graduate Student of Aquaculture, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG. Av Itália, km 08, Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil, 96201-900
- 3- Instituto de Ciências Fisiológicas, Federal University of Rio Grande – FURG. Av Itália, km 08, Carreiros, Rio Grande, RS – Brazil, 96201-900

*Correspond to: Wilson Wasielesky Jr. Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel S/N. RS, Brazil. ZIP CODE 96210-030 E-mail: manow@mikrus.com.br Phone (55)5332368042

Abstract

Litopenaeus vannamei is a tropical species that has been successfully reared in a wide range of salinities. The aim of the present paper was to determine oxygen consumption, total ammonia nitrogen (TAN) excretion and Na/K⁺ ATPase activity of *L. vannamei* juveniles exposed to different calcium concentrations at low salinity. The salinities tested were 2, 4 and 8ppt and the calcium concentration tested were: diluted sea water, 118, 236 and 354 mg/L. TAN excretion decreased with increased salinity level and decreases with increased calcium concentration in salinity 2 and 8. The respiration rates decreased with increasing salinity in diluted seawater. In treatments with calcium addition this pattern was not observed. Calcium addition appears to diminish oxygen uptake in salinity 2 and 4. Hemolymph osmolality values did not change with salinity or calcium concentration ($p>0.05$). Na/K⁺ ATPase activity was higher in salinity 2 (110.75 ± 9) than in salinity 4 (40.5 ± 11) and 8 (79 ± 13.6 mmol ADP mg protein⁻¹ h⁻¹) ptt ($p<0.05$). No differences were found for enzymatic activity between calcium concentration ($p=0.1$). The reduced TAN excretion and oxygen consumption at salinity 2ppt in treatments with calcium addition suggest that higher calcium concentration might be beneficial to *L. vannamei* living in low salinity waters. The Na⁺/K⁺ ATPase activity values were inconclusive due to molting stage sampled (intermolt). To determine if waterborne calcium concentration have an effect on this enzyme activity tissue samples should be taken in premolt and early post-molt stages when calcium uptake and movement are more intense in crustaceans. Further studies should focus on long term effects of calcium concentration on energy sparring and shrimp growth to verify if calcium supplementation might be a feasible choice for shrimp cultivation in low salinity waters.

Introduction

Osmoregulation is an essential physiological process for the majority of aquatic crustaceans since it enables them to cope with the changes between the ion concentrations within their bodies and the aquatic environments they inhabit. With the exception of strict osmoconformers, crustaceans living in all aquatic environments continually regulate their hemolymph osmolytes and ultimately, the strategy and strength of this process dictate the diversity of habitats a crustacean can successfully occupy. The ability to tolerate a wide range of salinities has made *Litopenaeus vannamei* a popular species for low salinity culture. It is a strong hyper-osmotic regulator in low salinity and an equally strong hypoosmotic regulator at high salinity (Roy et al., 2007).

Oxygen consumption and ammonia excretion have been used to assess physiological responses under various stressful environments in decapod crustaceans (Nelson et al., '77, Chen and Linn, '95). Respiratory metabolism is also appropriate for quantifying energetic expenditure under different salinity levels (Spaargaren et al., '82; Chen and Nan, '93; Allan et al., 2006).

The gills are the sites primarily involved in the active transport of Na⁺ and Cl⁻ between concentrated and dilute media in decapod crustaceans. Studies (Towle, '81; Neufeulde et al., '80) have shown that Na/K-ATPase has a central role in active Na uptake and plays a vital role in both whole body ion regulation and cellular water balance in euryhaline crustaceans.

In seawater, uptake of calcium via the calcium channel in the apical membrane is passive down an electrochemical gradient. In the case of euryhaline crustaceans in a low salinity or freshwater environment, the large increase in net uptake of calcium is through

active transport across the gill epithelium (Neufeuld and Cameron, '93). Moreover, it helps to maintain physiological homeostasis and decreases water and ionic permeability of cells. The purpose of the present paper was to determine oxygen consumption, total ammonia nitrogen (TAN) excretion and Na/K⁺ ATPase activity of *L. vannamei* juveniles exposed to different concentrations of calcium at different salinity in the laboratory.

Material and Methods

Animals and experimental set up.

The experiment was conducted at the Marine Station of Aquaculture (EMA/FURG), Federal University of Rio Grande - FURG. All tanks (3 L aquária) were stocked with 4 shrimp (1.8 ± 0.3 g mean weight \pm standard deviation). *Litopenaeus vannamei* nauplii were acquired from a commercial laboratory (Aquatec, Canguaretama, RN, Brazil) and kept in the larviculture sector of EMA until experimental use. Experimental media were prepared using filtered (5- μ m mesh filter) saltwater at 30 ppt collected at Cassino Beach (Rio Grande, RS, Southern Brazil). Water was diluted with distilled water to salinities 2, 4 and 8ppt. Different calcium concentrations were obtained adding CaCl₂ to the diluted saltwater. After calcium dissolution, the experimental media was gently aerated for 12h and a sample was collected for calcium determination by atomic absorption flame photometry (MicroNal, SP, Brazil).

The post larvae were gradually acclimated to low salinity by adding limited amounts of freshwater to dilute water salinity by approximately 2–5 ppt daily. When salinity reached 10ppt it was reduced by 1ppt/day to the experimental salinity concentration. After acclimation shrimp were weighed and stocked in experimental units. The experiment had 12 treatments and two factors: salinity (2, 4 and 8ppt) and calcium concentrations (diluted sea water,

118mg/L, 236 mg/L and 354 mg/L) each treatment had 4 replicates. The experimental units were 48 aquaria (3 L useful volume) randomly disposed within a controlled temperature water table (28 ± 1 °C).

Ammonia Excretion

Initial ammonia concentration was determined (UNESCO, '83) for each experimental unit and water samples were collected every 6h for a 48h period. Ammonia excretion was calculated by multiplying the observed difference of dissolved ammonia by the volume of water and by dividing the result by the wet body weight and time lapse ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Respirometry

For respirometry assays, Pyrex glass BOD bottles (~300 mL) were filled with each test solution. Shrimp were placed individually in each bottle 30min prior to experiment start to avoid any manipulation effect. Thereafter water was gently siphoned and replaced by test water. The bottle was capped and placed in the water table describe above. The experiment lasted for 2h. Dissolved oxygen (DO) was measured by titration (Grasshoff, '83). Oxygen consumption was calculated by multiplying the observed difference of dissolved oxygen by the volume of water and by dividing the result by the wet body weight and time lapse ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Additionally, 3 control bottles (just test water) were incubated for 2h to account for microbial respiration and the result was subtracted from shrimp respiration.

Na⁺/K⁺ ATPase Activity and Hemolymph Osmolality

Immediately after the last sample of ammonia excretion was, 4 shrimp were cryoanesthetized for posterior hemolymph collection (heart puncture) and gills dissection.

The hemolymph was collected by heart puncture. Samples were immediately frozen ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) until osmotic concentration analyses using a semi-micro osmometer (Knauer, Germany) based on the freezing depression points. Gills (anterior and posterior) were dissected, dried on filter paper, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for posterior analyses. One aliquot of each tissue sample was homogenized in 200 μL cold buffer (300 mM sucrose, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 100 mM imidazole, pH 7.3) and centrifuged (10,000 $\times g$; Mikro22R; Hettich, Germany) at 4°C , for 1 min. Na^+, K^+ -ATPase activity was measured in the supernatant following the NADH oxidation in a coupled system using pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, as described by McCormick (1993). Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated considering the difference in ADP production between two reaction mixtures (with and without 1 mM ouabain, a specific inhibitor of Na^+, K^+ -ATPase). Enzyme assays were run in triplicate at 20°C using a microplate. Absorbance readings (550 nm) were performed in a microplate reader (Victor- 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Waltham MA, USA) for 10 min. An ADP standard curve (0-20 nmol $10\text{ }\mu\text{L}^{-1}$) was built and used to calculate enzyme activity. Protein content in the homogenized supernatant was determined using a commercial reagent kit (Microprote, Doles Ltda., Goiânia, GO, Brazil) based on the Coomassie Blue reagent. Na^+, K^+ -ATPase activity was expressed as $\text{mmoles ADP mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Results

TAN excretion (Fig 1) decreased with increased salinity level and decreases with increased calcium concentration in salinity 2 and 8. The opposite pattern was observed in salinity 4 with higher excretion rate in high calcium concentration. A significant effect was observed for salinity and for interaction between calcium concentration and salinity ($p < 0.05$). No significant effect was observed for calcium concentration ($p = 0.08$). Average TAN

excretion rates for salinity 8, 4 and 2 ppt were (mean \pm SE) 0.014 ± 0.001 , 0.019 ± 0.001 and 0.027 ± 0.001 mg TAN g⁻¹ h⁻¹, respectively.

Shrimp respiration rates (Fig 2.) decreased with increasing salinity in diluted seawater. In treatments with calcium addition this pattern was not observed. Calcium addition appear to diminish oxygen uptake in salinity 2 and 4, although no statistical differences was observed for salinity, calcium concentration or interactions between these factors ($p > 0.05$).

Hemolymph osmolality (fig. 3) did not vary between salinity, a minor trend to higher osmolality in higher calcium concentration was observed in salinity 2 and 4 although no statistical difference was observed for salinity, calcium concentration or interaction was observed ($p > 0.05$). Mean osmolality for salinity 2, 4 and 8ppt was 628 ± 25 , 629 ± 17.1 and 656 ± 15.4 mOsm.

Results for Na⁺/K⁺ -ATPase activity are shown in figure 4. The lowest value (12 mmoles ADP / mg protein / h) was seen in the gills of shrimps exposed to salinity 4ppt and 118mg/L of calcium concentration. The higher value (140 mmoles ADP / mg protein / h) was found at salinity 2ppt and 236mg/L of calcium concentration. Average activity (\pm standard error) for salinities 2, 4 and 8ppt were 110.7 ± 9.5 , 40.5 ± 11 and 79 ± 14 mmoles ADP / mg protein / h, respectively.

Discussion

Decreasing salinity usually results in higher oxygen uptake by penaid shrimp (Kutty et al., '71; Chen and Lai, '93; Chen and Chen, '97). An increase in oxygen consumption under low salinity stress suggested that more energy is been spent to keep body homeostasis and

less energy may be available to grow. In the current work there was an increase in oxygen uptake as salinity diminishes in diluted water treatments. In salinity 2 and 4 treatments with calcium addition had lower respiration rates indicating that calcium addition in these salinities may be beneficial to shrimp. In salinity 8 this effect was not observed.

TAN excretion increase with decrease of salinity was documented for *P. japonicus* (Chen and Lai, '93) and for *P. chinensis* (Chen and Lin, '95). The mechanism of ammonia excretion in crustaceans are passive NH_3 efflux (Kormanik and Cameron, '81), NH_4 efflux (Maetz and Garcia-Romen, '64) and ion exchange of NH_4 for Na^+ (Pequeux and Gilles, '81). The higher TAN excretion in salinity 2 in this study might be due to increased amino acids catabolism. In low salinity shrimp tends to use protein as main energy sources (Chen and Chen '97) which results in increased TAN excretion. Other reason is a decrease in external osmotic concentration results in an increased metabolic rate of shrimp to actively pump ions lost to external media (Chen and Lai, '93) and, finally, at low salinity, the osmotic water inflow to shrimp increases, which is compensated by increased urine production to maintain water balance. To prevent losses of the alkali ions (Na and K), increased NH_4 partially replaces alkali ions in the formation of urine (Spaargaren et al., '82). It is noteworthy that at salinity 2 calcium addition had a direct impact on oxygen uptake and TAN excretion.

The small variation of osmotic shrimp osmolality, in relation to the different salinity tested, reinforces previous works that point to *L. vannamei* juveniles capacity to osmoregulate at low salinities (Castille and Lawrence, '81; Rodriguez, '81; Charmantier et al., '94; Rosas et al., 2002; Gong et al., 2004). No difference in osmoregulatory capacity was observed between salinity or calcium concentration. Thus, *L. vannamei* juveniles have the capacity to regulate osmotic pressure in salinities and calcium concentration tested.

Na^+/K^+ -ATPase activity was affected by salinity but was not affected by calcium concentration. Studies shows increased Na^+/K^+ ATPase activity as salinity drops (Hurtado et al. 2007) to counteract ion loss to hyposmotic media. The enzyme activity is also affected by molt stage as Na/K-ATPase activity functions in generating a sodium gradient for secondary calcium transport in premolt and early postmolt animals for calcification of the exoskeleton (Towle and Magno, '85, Flik et al., '94). Although, due to short time exposure to different calcium concentrations and the molting stage used (we only used shrimp at intermoult stage) for gill extirpation this effect was not observed.

In summary, the reduced TAN excretion and oxygen consumption at salinity 2ppt in treatments with calcium addition suggest that calcium addition might be a beneficial to *L. vannamei* living in low salinity waters. The Na^+/K^+ ATPase activity values were inconclusive due to molting stage sampled. To determine if waterborne calcium concentration have an effect on this enzyme tissue samples should be taken in premolt and early post-molt stages when calcium uptake and movement are more intense in crustaceans (Flik et al., '94).

Acknowledgments

The author would like to thank CAPES for the scholarship obtained during the realization of the current work and João Xavier for the help during experiment.

References

ALLAN EL. FRONEMAN PW. HODGSON AN. 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 337, 103–108.

- BIANCHINI A, CASTILHO PC. 1999. Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na^+ , K^+ -ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). *B Environ Contam Tox.* 62:63–69.
- CASTILLE FL, LAWRENCE AL. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 68, 75–80.
- CHARMANTIER G, SOYEZ C, AQUACOP. 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178:233–246
- CHEN JC, LAI SH. 1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and NH_3 -N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 165, 161–170.
- CHEN JC, NAN FH. 1994. Comparisons of oxygen consumption and ammonia-N excretion of five penaeids. *J. Crusact. Biol.* 14, 289–294.
- CHEN JC, CHI YL. 1995 Responses of Oxygen Consumption, Ammonia-N Excretion and Urea-N Excretion of *Penaeus chinensis* Exposed to Ambient Ammonia at Different Salinity and pH Levels. *Fish Res.* 136(95): 243–255.
- CHEN JC, CHEN KW. 1996. Hemolymph oxyhemocyanin, protein levels, acid-base balance, and ammonia and urea excretions of *Penaeus japonicus* exposed to saponin at different salinity levels. *Aquatic Toxicol.* 36:115-128.
- CHEN JC AND CHEN KW. 1997. Oxygen Uptake and Ammonia-N Excretion of Juvenile *Penaeus japonicas* during depuration following one day one day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels. *Aquaculture* 156:77–83.

- GONG H, JIANG DH, LIGHTNER, DV, COLLINS, C, BROCK D. 2004. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. *Aquac. Nutr.* 10, 227–236.
- GRASSHOFF K, EHRHARDT M, KREMLING K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*, second ed. Verlag Chemie, Weinheim, 419 pp.
- HURTADO MA, IS RACOTTA, R CIVERA, L IBARRA, M HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ AND E PALACIOS. 2007. Effect of Hypo- and Hypersaline Conditions on Osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase Activity in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Fed Low- and High-HUFA Diets. *Comp Biochem Physiol A* 147(3):703–10. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.002.
- KORMANIK GA AND CAMERON JN. 1981. Ammonia excretion in animals that breathe water: a review. *Mar. Biol. Lett.* 2:11-23.
- KUTTY MN. MURUGAPOOPATHY G, KRISHNAN TS. 1971. Influence of salinity and temperature on the oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. *Mar. Biol.* 11, 125-131.
- MAETZ J. AND GARCIA-ROMEN F. 1964. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish, *Carassius auratus*. II. Evidence for NH₄⁺/Na⁺ and HCO⁻/Cl⁻ exchange. *J. Gen. Physiol.* 47:1209-1227.
- MORRIS S AND EDWARDS T. 1995. Control of Osmoregulation via Regulation of Na⁺ / K⁺-ATPase Activity in the Amphibious Purple Shore Crab *Leptograpsus variegates*. *Comp Biochem Physiol A* 112(2):129–136.

- NEUFELD GJ, HOLLIDAY CW, PRITCHARD JB. 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J Exp Zool 211:215–224
- NEUFELD DS AND CAMERON JN. 1993. Transepithelial Movement of Calcium in Crustaceans. J. Exp. Biol. 184:1–16.
- PEQUEUX A AND GILLES R. 1981. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Exp Biol. 92: 173-186.
- RODRIGUEZ GA. 1981. Osmoregulation and total serum protein of two species of Penaeid shrimps from the Pacific coast of Mexico. J. Crustac. Biol. 1, 392–400
- ROSAS C, CUZON G, GAXIOLA G, PASCUAL C, TOBOADA G, ARENA L, VAN WORMHOUDT A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268, 47–67
- ROY LA, DAVIS AD, SAOUD PI, HENRY RP. 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. Comp Biochem Physiol A. 147:404–411
- SPAARGAREN DH, RICHARD P, CECCALDI HJ. 1982. Excretion of nitrogenous products by *Penaeus japonicus* Bate in relation to environmental osmotic conditions. Comp. Biochem. Physiol. 72A, 673–678.
- TOWLE DW. 1981. Transport related ATPase as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. J Exp Zool 218:89–95

TOWLE DW, MANGUM CP. 1985 Ionic regulation and transport ATPase activities during the molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*. J Crust Biol 5:216–222.

Figure Captions

Figure 1. Total ammonia nitrogen excretion of *L. vannamei* (mg TAN g⁻¹ hour⁻¹) at salinity 2, 4 and 8ppt and calcium concentrations diluted (diluted sea water with no calcium addition), 118, 236 and 354mg/L. Data are expressed as mean ± standard error. Different letters denotes significant difference (p<0.05)

Figure 2. Oxygen uptake of *L. vannamei* (mg O₂ g⁻¹ hour⁻¹) at salinity 2, 4 and 8ppt and calcium concentrations diluted (diluted sea water with no calcium addition), 118, 236 and 354mg/L. Data are expressed as mean ± standard error. Different letters denotes significant difference (p<0.05)

Figure 3. Hemolymph osmolality of *L. vannamei* (mOsm Kg⁻¹) at salinity 2, 4 and 8ppt and calcium concentrations diluted (diluted sea water with no calcium addition), 118, 236 and 354mg/L. Data are expressed as mean ± standard error. Different letters denotes significant difference (p<0.05)

Figure 4. *L. vannamei* gills Na⁺/K⁺ ATPase activity (mmoles ADP / mg protein/ hour) at salinity 2, 4 and 8ppt and calcium concentrations diluted (diluted sea water with no calcium addition), 118, 236 and 354mg/L. Data are expressed as mean ± standard error. Different letters denotes significant difference (p<0.05)

Figures

