

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL  
SUB-ÁREA: PISCICULTURA**

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA *Rhamdia quelen*  
EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA, OXIGÊNIO E Ca<sup>2+</sup> NA DIETA E  
NA ÁGUA**

**FRANCESCA WERNER FERREIRA**

**SANTA MARIA  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**  
**ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL**  
**SUB-ÁREA: PISCICULTURA**

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA *Rhamdia quelen***  
**EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA, OXIGÊNIO E Ca<sup>2+</sup> NA DIETA E**  
**NA ÁGUA**

**FRANCESCA WERNER FERREIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, Piscicultura.

Orientador: Dr. Bernardo Baldisserotto

**SANTA MARIA – 2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Curso de Pós Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA  
*Rhamdia quelen* EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA,  
OXIGÊNIO E  $Ca^{2+}$  NA DIETA E NA ÁGUA**

elaborada por  
**Francesca Werner Ferreira**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Zootecnia .**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. Bernardo Baldisserotto  
(Presidente/Orientador - UFSM)



Dr. Wálter Vásquez-Torres (Universidad Los Llanos, Colômbia)

Dr. João Radunz Neto (UFSM)

Dra. Kátia Padilha Barreto (UFSM)



Dr. Paulo Alberto Lovatto (UFSM)

Santa Maria, 11 de fevereiro de 2008

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,  
Vera Beatriz e Fúlvio (*in memoriam*)  
que, como grande herança,  
nos deram, a mim e aos meus irmãos,  
a vontade de estudar sempre,  
o amor pelos livros,  
pela cultura, pela busca do conhecimento,  
mais do que qualquer outro bem.

Ao Lorenzo, meu filho,  
que junto comigo, cresce a cada dia,  
tornando-se uma pessoa cada vez mais “humana”.

Durante meu crescimento como “pessoa-mãe”  
tento deixar para ele a mesma herança de meus pais.

Aos meus irmãos, Fátima, Fúlvio Luiz e Flávio,  
e a todos os meus sobrinhos e tios,  
também batalhadores em busca  
de suas culturas e saberes.

Me trouxeram alegrias e alívio, terças na casa da Mana,  
quintas, na casa da mãe  
e nos feriados, aquela “junção” na Toca da Coruja.

*“Aprender é superar um medo a cada dia”.*

Não sei de quem é essa frase,  
mas durante todo esse tempo, todas essas pessoas,  
foram essenciais no meu aprender  
e na superação dos meus medos.

A elas, todo o meu amor

## AGRADECIMENTOS

Se eu disser, como muitos colegas já disseram, que o Bernardo é meu “pai científico”, acho que seria injusta com ele. Afinal ele é só um pouco mais velho do que eu! Mas talvez seja a experiência, generosidade, paciência e, sobretudo, amor pelo seu trabalho, um exemplo para todos nós e por isso, ele é como um “pai”. Obrigada pela amizade e pelo bom humor de sempre.

Ao Radünz, posso dizer que nesses vinte e poucos anos de convivência, em diferentes momentos, seu carinho e atenção sempre me acompanharam. No início de cada um dos experimentos ele foi dar a sua “benção” e desejar um bom trabalho. Só isso já demonstra o seu interesse e também grande generosidade.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes dessa Universidade, filhos do Bernardo e, portanto, meus irmãos (Ana Paula, Daiani, Luciano, Mauro, Keidi, Alexssandro, Carlos, Neiva, Ronaldo, Jaqueline), agradeço a amizade, a alegria e disposição para auxiliarem nos experimentos. De todos, o Rafael foi aquele que nas madrugadas, enfrentou comigo as dificuldades, que no início foram inúmeras pela nossa inexperiência, mas com o tempo, superadas. No final sobraram muitas risadas.

Aos colegas do Setor de Piscicultura, ou seja, os filhos do Radunz (Parra, Rafael, Fábio, Cátia, Mário, Marcos), sempre dispostos a ajudar e tirar minhas dúvidas “zootécnicas”.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia, coordenado pelo professor Carlos Melo, que mesmo a distância, proporcionou a utilização do Espectrofotômetro. Fomos muito bem recebidos naquele laboratório.

Aos demais professores do departamento de Fisiologia, em especial a Kátia e a Maria Amália, pela convivência e incentivo.

Aos professores Luis Felipe Dias, Paulo Lovatto (professor e primeiro coordenador) e Julio Viegas (atual coordenador), pelo apoio e incentivo. A Olirta, secretária do curso, pela dedicação e carinho.

A UNIJUI, em especial aos colegas do Departamento de Biologia e Química pelo apoio durante o curso.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**  
**ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL**  
**SUB-ÁREA: PISCICULTURA**

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA *Rhamdia quelen***  
**EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA, OXIGÊNIO E  $Ca^{2+}$  NA DIETA E**  
**NA ÁGUA**

Autora: Francesca Werner Ferreira  
Orientador: Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, 11 de fevereiro de 2008

**RESUMO GERAL**

Este trabalho teve como objetivos verificar os efeitos da adição de  $Ca^{2+}$  na ração e na água na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes níveis de amônia e oxigênio dissolvido. No experimento para verificar a eficácia da adição de  $Ca^{2+}$  na ração sobre a concentração letal 96h ( $CL_{50-96h}$ ) da amônia ( $NH_3$ ) os juvenis ( $4.06 \pm 0.27g$  e  $7.82 \pm 1.2cm$ ) foram expostos a cinco níveis de  $NH_3$  (em mg/L):  $0,107 \pm 0,007$  (controle);  $0,360 \pm 0,021$ ;  $0,773 \pm 0,074$ ;  $1,170 \pm 0,071$  e  $1,630 \pm 0,315$  e quatro níveis de  $Ca^{2+}$  na dieta (em %  $Ca^{2+}$ ): 0,45; 0,95; 1,45 e 2,45. Para verificar a eficácia do  $Ca^{2+}$  na água sobre a  $CL_{50-96h}$  da  $NH_3$ , os juvenis ( $1,85 \pm 0,6g$  e  $6,0 \pm 0,54cm$ ) foram mantidos em cinco níveis de  $NH_3$  (mg/L):  $0,097 \pm 0,017$  (controle);  $0,356 \pm 0,037$ ;  $0,779 \pm 0,141$ ;  $1,459 \pm 0,185$  e  $1,770 \pm 0,070$  e quatro níveis de dureza (em mg  $CaCO_3/L$ ):  $34,5 \pm 4,4$ ;  $62,0 \pm 5,7$ ;  $116,0 \pm 9,3$  e  $174,0 \pm 22,42$ . No experimento para avaliar a eficácia da adição de  $Ca^{2+}$  na ração sobre a  $CL_{50-96h}$  do  $O_2$ , os juvenis ( $4,75 \pm 0,65g$  e  $7,56 \pm 0,61cm$ ) foram expostos a cinco níveis de  $O_2$  (em mg/L): ( $0,41 \pm 0,13$ ;  $0,71 \pm 0,15$ ;  $0,97 \pm 0,13$ ;  $1,44 \pm 0,35$  e  $6,41 \pm 0,60$  mg/L) e quatro níveis de  $Ca^{2+}$  na dieta (em %  $Ca^{2+}$ ): 0,45; 0,95; 1,45 e 2,45. Para verificar a eficácia do  $Ca^{2+}$  na água sobre a  $CL_{50-96h}$  do  $O_2$ , os juvenis ( $3,66 \pm 0,75g$  e  $7,2 \pm 0,5cm$ ) foram mantidos em cinco níveis de  $O_2$  (mg/L):  $0,27 \pm 0,10$ ;  $0,74 \pm 0,26$ ;  $1,33 \pm 0,14$ ;  $1,74 \pm 0,32$  e  $6,55 \pm 0,02$  mg.L<sup>-1</sup>) e quatro níveis de dureza (em mg  $CaCO_3/L$ ): (28, 116, 116 e 180). Para verificar a influência do  $Ca^{2+}$  na água sobre a sobrevivência e o crescimento, os juvenis ( $2,27 \pm 0,14g$  e  $6,9cm$ ) foram mantidos em dois níveis de  $NH_3$  (mg/L),  $0,021 \pm 0,001$  e  $0,623 \pm 0,039$ , e quatro níveis de dureza na água (mg  $CaCO_3/L$ ):  $32,1 \pm 4,6$ ;  $63,1 \pm 5,9$ ;  $119,9 \pm 10,0$  e  $177,3 \pm 8,1$  por 40 dias. No segundo experimento de crescimento, os juvenis ( $3,66 \pm 0,75g$  e  $7,32 \pm 0,5cm$ ) foram mantidos dois níveis de  $O_2$  ( $1,47 \pm 0,04$  e  $6,46 \pm 0,06$  mg/L), e quatro níveis de dureza na água (mg  $CaCO_3/L$ ):  $30 \pm 2,0$ ;  $61 \pm 2,5$ ;  $121 \pm 3,0$  e  $180 \pm 3,0$  por 15 dias. A  $CL_{50-96h}$  para  $NH_3$  foi de  $0,73$  mg.L<sup>-1</sup> (CI 0,63 – 0,84) no experimento com  $Ca^{2+}$  na dieta, com uma diferença significativa nos juvenis alimentados com 0,45 e 0,95% de  $Ca^{2+}$  na dieta. A dureza na água não influenciou a  $LC_{50-96h}$   $NH_3$ , que foi de  $1,20$  mg/L (CI 1,10 - 1,24). No experimento para avaliar a influência dos níveis de  $NH_3$  no crescimento,

o ganho de peso, biomassa e taxa de crescimento específico foram significativamente maiores nos juvenis expostos ao nível mais baixo de  $\text{NH}_3$ , do que naqueles mantidos no nível mais alto de  $\text{NH}_3$ . Nesse experimento o aumento da dureza prejudicou os juvenis expostos ao nível mais baixo de  $\text{NH}_3$ , mas o aumento beneficiou os juvenis mantidos no nível mais alto de  $\text{NH}_3$  em todos os parâmetros avaliados. A  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  para o  $\text{O}_2$  foi de 0.89 mg/L (CI 0,64 – 1,34 mg/L) no experimento com  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta e foi maior nos juvenis alimentados com 2.45 e 0.45% de  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta. O ganho de peso, a biomassa, o comprimento e a taxa de crescimento específico foram significativamente maiores nos juvenis mantidos nas concentrações de  $1,47 \pm 0,04$  mg/L  $\text{O}_2$  do que os expostos a  $6,46 \pm 0,06$  mg/L  $\text{O}_2$ . O aumento da dureza foi positivo para todos os parâmetros medidos nos juvenis expostos ao nível mais baixo de  $\text{O}_2$ , mas prejudicou aqueles submetidos ao nível mais alto de  $\text{O}_2$ . Este estudo indicou que dietas com baixos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam a sobrevivência de juvenis de jundia expostos a altos níveis de  $\text{NH}_3$  e baixas concentrações de  $\text{O}_2$ , e ao aumento da dureza da água pode ser recomendada somente quando essa espécie é submetida a situações de hipóxia e altos níveis de  $\text{NH}_3$ .

Palavras-chave: cálcio na dieta, dureza, oxigênio dissolvido, amônia, *Rhamdia quelen*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**  
**ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL**  
**SUB-ÁREA: PISCICULTURA**

**SURVIVAL AND GROWTH OF SILVER CATFISH JUVENILES *Rhamdia quelen***  
**EXPOSED TO DIFFERENT AMMONIA, OXYGEN AND DIETARY  $Ca^{2+}$  AND**  
**WATER HARDNESS**

Authoress: Francesca Werner Ferreira  
Orientador: Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, 11 de fevereiro de 2008

**ABSTRACT**

The present study examined the effect of experimentally elevating dietary  $Ca^{2+}$  and water hardness on survival and growth of silver catfish, *Rhamdia quelen*, exposed to different waterborne  $NH_3$  and  $O_2$  levels. In the dietary  $Ca^{2+}$  experiment of determination of  $NH_3$  lethal concentration in 96 h ( $LC_{50-96h}$ ) juveniles ( $4.06 \pm 0.27g$  and  $7.82 \pm 1.2cm$ ) were exposed to five different  $NH_3$  levels (in  $mg.L^{-1}$ ):  $0.107 \pm 0.007$  (control),  $0.36 \pm 0.021$ ,  $0.773 \pm 0.074$ ,  $1.170 \pm 0.071$  and  $1.63 \pm 0.315$  and four dietary  $Ca^{2+}$  levels (in %  $Ca^{2+}$ ): 0.45, 0.95, 1.45, and 2.45. In the waterborne  $Ca^{2+}$  experiment of  $LC_{50-96h}$  juveniles ( $1.85 \pm 0.6g$  and  $6.0 \pm 0.54cm$ ) were maintained at five different  $NH_3$  levels ( $mg.L^{-1}$ ):  $0.097 \pm 0.017$  (control),  $0.356 \pm 0.037$ ,  $0.779 \pm 0.141$ ,  $1.459 \pm 0.185$  and  $1.770 \pm 0.070$  and four water hardness levels (in  $mg CaCO_3.L^{-1}$ ):  $34.5 \pm 4.4$ ,  $62.0 \pm 5.7$ ,  $116.0 \pm 9.3$ , and  $174.0 \pm 22.42$ . In the dietary  $Ca^{2+}$  experiment of determination of  $O_2$  lethal concentration in 96 h ( $LC_{50-96h}$ ) juveniles ( $4.75 \pm 0.65 g$  e  $7.56 \pm 0.61 cm$ ) were exposed to five different  $O_2$  levels (in  $mg.L^{-1}$ ): ( $0.41 \pm 0.13$ ,  $0.71 \pm 0.15$ ,  $0.97 \pm 0.13$ ,  $1.44 \pm 0.35$  e  $6.41 \pm 0.60 mg/L$ ) and four dietary  $Ca^{2+}$  levels (in %  $Ca^{2+}$ ): 0.45, 0.95, 1.45, and 2.45. In the waterborne  $Ca^{2+}$  experiment of  $LC_{50-96h}$  juveniles ( $3.66 \pm 0.75 g$  e  $7.32 \pm 0.5 cm$ ) were maintained at five different  $O_2$  levels ( $mg.L^{-1}$ ): ( $0.27 \pm 0.10$ ,  $0.74 \pm 0.26$ ,  $1.33 \pm 0.14$ ,  $1.74 \pm 0.32$  e  $6.55 \pm 0.02 mg.L^{-1}$ ) and four water hardness levels (in  $mg CaCO_3.L^{-1}$ ): (28, 116, 116 e 180). In the growth experiment juveniles ( $2.27 \pm 0.14g$  and  $6.9 \pm 0.13cm$ ) were exposed to two  $NH_3$  levels ( $mg.L^{-1}$ ),  $0.021 \pm 0.001$  and  $0.623 \pm 0.039$ , and four water hardness levels ( $mg CaCO_3.L^{-1}$ ):  $32.1 \pm 4.6$ ,  $63.1 \pm 5.9$ ,  $119.9 \pm 10.0$ , and  $177.3 \pm 8.1$  for 40 days. In the growth experiment juveniles ( $3.66 \pm 0.75g$  and  $7.32 \pm 0.5cm$ ) were exposed to two  $O_2$  levels ( $1.47 \pm 0.04$  and  $6.46 \pm 0.06 mg.L^{-1}$ ), and four water hardness levels ( $mg CaCO_3.L^{-1}$ ):  $30 \pm 2.0$ ,  $61 \pm 2.5$ ,  $121 \pm 3.0$  e  $180 \pm 3.0$  for 15 days. The  $NH_3 LC_{50-96h}$  was



0.73 mg.L<sup>-1</sup> (0.63 - 0.84) in the dietary Ca<sup>2+</sup> experiment, and LC<sub>50-96h</sub> was significantly higher in juveniles fed 0.45 and 0.95% dietary Ca<sup>2+</sup>. Water hardness did not change significantly NH<sub>3</sub> LC<sub>50-96h</sub>, which was 1.20 mg.L<sup>-1</sup> (1.10 - 1.24). Weight gain, biomass and specific growth rate at end of the growth experiment were significantly higher in juveniles exposed to 0.021 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> than those exposed to 0.623 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>. The increase of water hardness impaired all measured parameters in juveniles exposed to the lowest NH<sub>3</sub> level, but increased them in those exposed to the highest NH<sub>3</sub> level. The O<sub>2</sub> LC<sub>50-96h</sub> was 0.89 mg/L (CI 0.64 – 1.34 mg/L) in the dietary Ca<sup>2+</sup> experiment, and LC<sub>50-96h</sub> was significantly higher in juveniles fed 2.45 e 0.45% dietary Ca<sup>2+</sup>. Weight gain, biomass, length and specific growth rate at end of the growth experiment were significantly higher in juveniles exposed to 6.46±0.06 than those exposed to 1.47±0.04 mg.L<sup>-1</sup>O<sub>2</sub>. The increase of water hardness increased all measured parameters in juveniles exposed to the lowest O<sub>2</sub> level, but them impaired in those exposed to the highest O<sub>2</sub> level. This study indicates that low dietary Ca<sup>2+</sup> enhanced survival of silver catfish exposed to high NH<sub>3</sub> and low O<sub>2</sub> levels, and that the increase of water hardness is recommended only when this species is raised in waters with high growth NH<sub>3</sub> and low O<sub>2</sub> levels.

*Keywords* : Dietary calcium, Water hardness, Oxygen, Un-ionized ammonia, Fish, *Rhamdia quelen*

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Table 1 - LC<sub>50-96h</sub> NH<sub>3</sub> of silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different levels of dietary and waterborne Ca<sup>2+</sup> (water hardness). Different letters in the columns indicate significant difference by one-way ANOVA and Tukey test (P< 0.05). ..... 49

Table 2 - Weight gain, biomass, specific growth rate, condition factor and length of silver catfish exposed to different NH<sub>3</sub> and water hardness levels..... 50

### Capítulo 3

Tabela 1 – CL<sub>50-96h</sub> O<sub>2</sub> para juvenis de jundia (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes níveis de Ca<sup>2+</sup> na dieta e dureza na água. Diferentes letras indicam diferença significativa através de Análise de Variância (two-way ANOVA) e teste de Tukey (P< 0,05). ..... 72

Tabela 2 – Ganho de peso (g/ 15 dias), ganho de biomassa (g/ 15 dias), taxa de crescimento específico (%dia), fator de condição (g/ cm<sup>3</sup>) e comprimento (cm) de juvenis de jundia expostos a diferentes concentrações de O<sub>2</sub> e dureza na água após 15 dias. .... 73

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figure 1 – Total Na<sup>+</sup> levels in gut tissue and plasma of rainbow trout fed for 7 days with different Na<sup>+</sup> levels in the diet (and also exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> waterborne Cu for 6 h). Adapted from Pyle et al. (2003).....25

Figure 2 - Calcium, Mg<sup>2+</sup> and P concentrations in scales and bone of blue tilapia fed with diets with different Ca<sup>2+</sup> levels for 24 weeks. Data from O'Connell and Gatlin (1994).....29

Figure 3 - Ca<sup>2+</sup> (A) whole body uptake of rainbow trout exposed to diets with different Ca<sup>2+</sup> concentrations. Means ± 1 SEM (N = 8–9). Adapted from Baldisserotto et al. (2004a, b).....30

### Capítulo 2

Figure 1 – weight gain (a), biomass gain (b), specific growth rate (c) and condition factor (d) of silver catfish juveniles exposed to different NH<sub>3</sub> levels and water hardness levels for 40 days (● = 0.021 and; ○ = 0.623 mg NH<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>, low and high levels, respectively). .....51

### Capítulo 3

FIGURA 1 – Ganho de peso (A), ganho de biomassa (B), comprimento (C) e taxa de crescimento específico (D) de juvenis de jundia expostos a diferentes níveis de oxigênio dissolvido e durezas na água por 15 dias (● = 1,47 e ○ = 6,46 mg/LO<sub>2</sub>, respectivamente, nível mais baixo e mais alto de O<sub>2</sub>).....74

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
1.1 Variáveis físico-químicas para cultivo de peixes .....	15
1.2 <i>Rhamdia quelen</i> , o jundiá.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo Geral .....	21
2.2 Objetivos Especificos.....	21
<b>CAPITULO 1 DIET AND OSMOREGULATION</b> .....	<b>23</b>
Introduction .....	23
Dietary Na <sup>+</sup> and Cl <sup>-</sup> .....	24
Dietary Ca <sup>++</sup> .....	28
Dietary Phosphorus.....	31
Dietary Mg <sup>2+</sup> .....	31
Acknowledgements .....	34
References.....	34
<b>CAPITULO 2 SURVIVAL AND GROWTH OF SILVER CATFISH, <i>RHAMDIA QUELEN</i>, JUVENILES EXPOSED TO DIFFERENT WATERBORNE NH<sub>3</sub> LEVELS AND DIETARY AND WATERBORNE CA<sup>2+</sup></b> .....	<b>41</b>
Abstract.....	42
1 Introduction .....	43
2 Material and methods.....	45
2.1 Experimental animals.....	45
2.2 Water Quality analysis .....	45
2.3 LC <sub>50-96h</sub> NH <sub>3</sub> X Ca <sup>2+</sup> diets .....	45
2.4 LC <sub>50-96h</sub> 5 NH <sub>3</sub> levels X 4 water hardness levels .....	46
2.5 Growth experiment (NH <sub>3</sub> X water hardness).....	47
2.6 Statistical analysis.....	48
3 Results .....	48
3.1 LC <sub>50-96h</sub> NH <sub>3</sub> and dietary Ca <sup>2+</sup> levels.....	48
3.2 LC <sub>50-96h</sub> NH <sub>3</sub> and water hardness levels.....	48
3.3 Interaction NH <sub>3</sub> x water hardness and growth.....	49
4 Discussion.....	51
Acknowledgements .....	54
References.....	54
<b>CAPÍTULO 3 SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA, <i>RHAMDIA QUELEN</i>, EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE O<sub>2</sub> E DE CA<sup>2+</sup> NA DIETA E NA ÁGUA</b> .....	<b>60</b>
ABSTRACT .....	61
RESUMO .....	62
1 INTRODUÇÃO.....	63
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	67

2.1 Animais Experimentais .....	67
2.2 Análises de Qualidade de Água.....	68
2.3 CL <sub>50-96h</sub> O <sub>2</sub> X Ca <sup>2+</sup> na Dieta.....	68
2.4 CL <sub>50-96h</sub> O <sub>2</sub> X Dureza da Água.....	69
2.5 Experimento de Crescimento (O <sub>2</sub> X dureza).....	69
2.6 Análise Estatística.....	70
3 Resultados .....	70
3.1 CL <sub>50-96h</sub> O <sub>2</sub> e Diferentes Níveis de Ca <sup>2+</sup> na Dieta.....	70
3.2 CL <sub>50-96h</sub> O <sub>2</sub> Diferentes Níveis de Dureza na Água.....	71
3.3 Interação entre O <sub>2</sub> x Dureza da Água e Crescimento .....	72
4 DISCUSSÃO.....	74
AGRADECIMENTOS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil a atividade pesqueira é responsável por 75% do pescado consumido anualmente, cerca de 1 milhão de toneladas, sendo que a aquicultura contribuiu, em 2005, com apenas 257 mil t/ano (17,8%), o que é insuficiente para cobrir um déficit anual de 336.358 t/ano, adquiridas através de importações (IBAMA, 2007).

A aquicultura em 2005 apresentou um decréscimo de 0,7% na participação relativa da produção de pescado em relação a 2004. Entre 1997 e 2005, essa participação apresentou um comportamento de crescimento. No entanto, o crescimento da produção da piscicultura de água doce no Brasil que vinha ocorrendo de forma contínua até 2001, estagnou no triênio 2002-2004 quando praticamente não houve aumento na produção. Na região Sul e no Rio Grande do Sul os últimos dados mostram estagnação com tendência de queda de produção nos últimos dois anos amostrados (IBAMA, 2004, 2007). Apesar disso, a região continua contribuindo com a maior parcela na produção nacional de pescado cultivado, 32,9% (59.204 t em 2005), sendo as carpas e a tilápia as espécies mais representativas, com a maior produção concentrada no Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Os peixes mais cultivados no Rio Grande do Sul são as carpas (várias espécies que recebem esta denominação foram agrupadas na estatística do IBAMA), que representaram 87 – 89% do total nos últimos anos. A tilápia, *Oreochromis niloticus*, manteve uma produção mais ou menos constante nos últimos anos, mas a porcentagem em relação ao total aumentou de 5,6 para 8% porque a produção total diminuiu (Baldisserotto, 2006). O estado produziu em 2005, 23 mil t de peixes cultivados, embora possua condições geográficas favoráveis para uma maior produção. A piscicultura insere-se no processo de diversificação buscado pelos produtores rurais, como uma alternativa de trabalho e renda, visando um maior desenvolvimento.

A espécie nativa com maior presença em piscicultura de água doce no estado é o jundiá, *Rhamdia quelen*, mas nos últimos anos sua produção caiu drasticamente de 7,6 para 1,5% do total. A produção de outras espécies nativas é proporcionalmente muito pequena (IBAMA, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005).

Durante vários anos a comunidade científica e o setor produtivo têm mostrado interesse na utilização de peixes nativos na piscicultura brasileira. Apesar disso, ainda há carência de “pacotes tecnológicos” desenvolvidos que possibilitem o fomento da atividade. Nesse sentido é necessário incrementar a pesquisa sobre a adaptação de espécies nativas ao cultivo, com a finalidade de avaliar seu desempenho em relação às espécies exóticas como as diferentes carpas (*Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis*, *Ctenopharingodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). Além do jundiá as espécies nativas mais cultivadas no estado, de forma ainda incipiente, são o dourado (*Salminus brasiliensis*), a piava (*Leporinus obtusidens*), o grumatã (*Prochilodus lineatus*), o pintado (*Pimelodus* sp.), o bocudo (*Steindachneridion scriptum*). Essas espécies são muito apreciadas tanto por produtores quanto pelos consumidores tendo, portanto, têm um mercado em potencial (ZANIBONI FILHO, 2002).

O conhecimento da biologia/ecologia das espécies nativas possibilitará um maior desenvolvimento no seu cultivo, promovendo uma diminuição da pesca predatória, além de incrementar o repovoamento destas espécies nos rios de origem, a partir de projetos específicos para tal finalidade. Além disso, o conhecimento técnico das fases de produção das espécies nativas mais cultivadas no estado é condição fundamental para viabilizar essa atividade.

Sabe-se que o melhor lugar para o cultivo dessas espécies é o seu local de origem, pois são aclimatadas às condições ambientais locais, sendo que algumas se alimentam mesmo que a temperatura ambiente se encontre baixa, evitando-se desta forma, perdas oriundas de extremos climáticos. Além da dieta natural dessas espécies consistir de alimentos de origem autóctone, elas possuem alto valor comercial pelo sabor da carne e pelo fato da população estar acostumada a consumi-las (ZANIBONI FILHO, 2002).

### **1.1 Variáveis físico-químicas para cultivo de peixes**

Em tanques de cultivo é comum ocorrerem oscilações das variáveis ambientais, como os níveis de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, amônia, entre outros, o que muitas vezes, pode causar grandes frustrações aos produtores. Uma

água de má qualidade leva os peixes ao estresse, afetando sua sobrevivência e seu crescimento e tornando-os mais sensíveis às enfermidades em geral.

Dentre as variáveis que influenciam a qualidade da água a amônia é descrita como um dos fatores mais limitantes para a sobrevivência e o crescimento dos organismos aquáticos (RUSSO & THURSTON, 1991; TOMASSO, 1994). É o principal composto nitrogenado excretado pelos peixes ósseos, sendo eliminada principalmente pelas brânquias. Este composto é tóxico para a maioria dos organismos e por isso, em sistemas de cultivo com altas densidades, a amônia pode alcançar níveis que comprometem a bom desenvolvimento da atividade (TOMASO ET AL., 1980; WAJSBROT ET AL., 1993).

A amônia, na água, existe nas formas de  $\text{NH}_4^+$  (ionizada) ou  $\text{NH}_3$  (não ionizada). O equilíbrio químico entre as duas depende de diversas variáveis ambientais como temperatura, alcalinidade, salinidade, níveis de oxigênio e em grande parte, pH (BOYD, 1990; HANDY & POXTON, 1993; FOSS ET AL., 2004). Ambas as formas,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$ , são tóxicas para peixes, porém a  $\text{NH}_3$  parece ser muito mais tóxica.

Em sistemas de cultivo com altas densidades, a concentração de  $\text{NH}_3$  pode aumentar causando redução no crescimento ou até mesmo alta mortalidade (PERSON-LE-RUYET ET AL., 1997). Por isso é importante determinar os limites de tolerância para as diferentes espécies, verificando quais os níveis que causam distúrbios fisiológicos e redução no crescimento.

Em pisciculturas podem ocorrer quedas bruscas nas concentrações de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) na água, especialmente quando os peixes são colocados em altas densidades. Deve-se dar uma considerável atenção a essa variável, pois ambientes com baixas concentrações de oxigênio interferem no crescimento, no consumo de alimento e no estado fisiológico dos peixes (JOBILING, 1994; PICHAVANT ET AL., 2001; BRAUN ET AL., 2006).

A baixa concentração de oxigênio na água e altos níveis de amônia são os principais fatores letais para os peixes. Para *Tinca tinca*, a concentração considerada letal ( $\text{LC}_{50-24\text{h}}$ ) é de  $1,2 \text{ mg. L}^{-1}$ , enquanto que para *Thymallus thymallus* é de  $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que a  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  para a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* é de  $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$  (MAGAUD ET AL., 1997).



Muitos estudos sobre a relação entre  $O_2$  e crescimento foram conduzidos com espécies de peixes dulciaquícolas e os níveis que afetam o crescimento são variáveis conforme a espécie. Em *Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka*, *Micropterus salmoides* e *Cyprinus carpio*, o crescimento é afetado por concentrações menores do que  $4-5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $O_2$  (BRETT & BLACKBURN, 1981). Para a truta arco-iris, a concentração de  $O_2$  limite para crescimento é muito maior,  $7 \text{ mg.L}^{-1}$  (PEDERSEN, 1987). Essa redução no crescimento em peixes submetidos à hipóxia pode ocorrer devido ao aumento da ventilação branquial, o que provoca diminuição da energia disponível para o crescimento e ingestão de alimento (JOBILING, 1994).

A qualidade da água em cultivos é afetada também por outras variáveis como o pH e a dureza. A dureza da água é determinada pelo conteúdo de sais de  $Ca^{2+}$  e de  $Mg^{2+}$ , os quais podem ser abundantes na água doce, e estão ligados aos íons carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) e bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) ou a sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), cloreto ( $Cl^-$ ) e outros ânions de acidez mineral (ARANA, 2004). O calcário utilizado para aumentar a dureza e/ou pH em tanques de cultivo pode ter diferentes concentrações de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  os quais podem aumentar as taxas de sobrevivência e o crescimento (SILVA ET AL., 2005).

Peixes dulciaquícolas e adaptados a águas com baixa salinidade são hiperosmóticos em relação ao meio, apresentando um efluxo de íons por difusão branquial pele, urina e fezes. Essa perda difusiva pode ser compensada pela captação ativa a partir da água, através das brânquias (WOOD, 2001), a partir da dieta, através do intestino (DABROWSKI ET AL., 1986; BUDDINGTON ET AL., 1987; BOGÉ ET AL., 1988; BALDISSEROTTO ET AL., 1993; KERSTETTER & WHITE, 1994; BALDISSEROTTO & MIMURA, 1995; BIJVELDS ET AL., 1998), e em algumas espécies como o muçum, *Synbranchus marmoratus*, pela da captação através da pele (STIFFLER ET AL., 1986).

Os peixes absorvem o  $Ca^{2+}$  para crescimento e homeostasia predominantemente através das brânquias, diretamente da água. Esta captação branquial é um processo ativo mais ou menos contínuo e relativamente dependente dos níveis de  $Ca^{2+}$  na água (FLIK ET AL., 1996). Os peixes também obtêm o  $Ca^{2+}$  a partir do alimento e da água através do intestino (FLIK ET AL., 1993; FLIK & VERBOST, 1995), embora sob condições normais, sem estresse, a taxa de ingestão de água em peixes de água doce, seja muito pequena e a contribuição do intestino é

restrita ao  $\text{Ca}^{2+}$  presente no alimento (FLIK ET AL., 1996). A razão entre  $\text{Ca}^{2+}$  captado da água e da dieta, ou seja, a contribuição das brânquias ou do intestino na captação do  $\text{Ca}^{2+}$  é variável e depende das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na água e no alimento. Em peixes expostos a águas com baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  a contribuição relativa do alimento aumenta, enquanto que dietas pobres em  $\text{Ca}^{2+}$  estimulam a captação branquial.

O  $\text{Ca}^{2+}$  exerce um papel fundamental na regulação iônica porque influi na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o efluxo difusivo e a alta perda iônica (WURT & DURBOROW, 1992; GONZALEZ, 1996). A elevação do cálcio ambiental aumenta a tolerância do peixe a várias substâncias tóxicas, inclusive à amônia, provavelmente por diminuir a permeabilidade da membrana branquial a esse excreta (TOMASSO ET AL., 1980; BALDISSEROTTO, 2002). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  induz a um aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  através do aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{k}^+\text{ATPase}$ , compensando sua depleção plasmática, aumentando a tolerância do peixe à amônia (WALSH ET AL., 2007).

Muitas pesquisas têm mostrado que um nível adequado de  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta pode melhorar o desempenho de várias espécies na regulação iônica. Em águas com baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , os peixes utilizam o suprimento dietético desse mineral para controlar o fluxo de íons pelas brânquias. Deste modo, se houver diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na água, poderá haver uma limitação no crescimento, já que o íon oriundo da dieta será utilizado primariamente para regulação osmótica. Assim, pode ser viável incrementar a utilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na ração, pois as quantidades utilizadas são menores do que as que seriam empregadas para aumentar os níveis de dureza da água, diminuindo custos (RODGERS, 1984).

Baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na água (0,125 mM) e na dieta reduzem a taxa de crescimento em *Salvelinus fontinalis* (RODGERS, 1984) demonstrando que um mínimo de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  através das brânquias e/ou intestino é necessária para um crescimento normal dos peixes (BALDISSEROTTO ET AL, 2004).

Os efeitos da dureza da água sobre o crescimento variam de acordo com a espécie de peixe e a qualidade da água. Espécies que são encontradas em ambientes naturais de água dura requerem a mesma qualidade para um bom desenvolvimento, enquanto que para aquelas encontradas naturalmente em águas

moles, águas duras podem ocasionar efeitos deletérios prejudicando seu crescimento e sobrevivência (PARRA & BALDISSEROTTO, 2007).

## 1.2 *Rhamdia quelen*, o jundiá

O jundiá, *Rhamdia quelen* QUOY & GAIMARD, 1824 (Siluriformes, Teleostei) é uma espécie nativa das Américas Central e do Sul, encontrado do sudeste do México à região central da Argentina (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2005) sendo bastante difundida na região sul do Brasil. A partir de trabalhos de Bockmann & Guazzelli (2003), a Família Pimelodidae foi dividida em Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Heptapteridae e o gênero *Rhamdia* passou a pertencer a essa última.

A espécie possui hábito bento-pelágico, sendo encontrada em ambientes lênticos com fundo arenoso ou lodoso, escondendo-se sob pedras e troncos, de onde sai à noite para alimentar-se. Apresenta hábito alimentar onívoro, com tendência a carnívoro consumindo principalmente peixes e insetos (GUEDES, 1980; GOMES ET AL., 2000). O jundiá aceita alimento artificial (ULIANA, 1997; PIAIA & RADUNZ NETO, 1997A,B; CARDOSO, 1998), podendo aproveitar bem fontes protéicas tanto de origem animal quanto vegetal (COLDEBELLA & RADUNZ, 2002). Este peixe alcança a maturidade sexual no primeiro ano de vida, é ovulípara, apresentando dois picos reprodutivos por ano, na primavera e verão, podendo desovar muitas vezes nestes períodos (SILVA ET AL., 2003).

Outras pesquisas analisaram o efeito de diversas variáveis físico-químicas da água sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de jundias. Com relação ao pH, foi demonstrado que alevinos de jundiá toleram uma variação de pH na faixa de 4,0 a 9,0, com dureza total de 30 mg/L de CaCO<sub>3</sub> (ZAIIONS & BALDISSEROTTO, 2000), e que em pHs ácidos (3,75) o aumento nos níveis de dureza da água para 70 mg/L de CaCO<sub>3</sub>, é suficiente para melhorar a sobrevivência de alevinos (TOWNSEND & BALDISSEROTTO, 2001). Em águas muito alcalinas, com pH 10 e 10,5, é necessário um aumento na dureza da água para 300 mg/L CaCO<sub>3</sub> para melhorar a sobrevivência.

O jundiá é considerado euritérmico, sendo que os juvenis são mais tolerantes do que as larvas às variações de temperatura (CHIPPARI-GOMES ET AL., 1999,

2000). É uma espécie estenoalina (MARCHIORO & BALDISSEROTTO, 1999; GOMES ET AL., 1999), que tolera até 9,0 g/L de sal comum (NaCl) por 96 horas, sendo o emprego de sal importante para prevenção e tratamento de ictioparasitas (MIRON ET AL., 2003), porém em concentrações menores para uma melhor margem de segurança.

Em relação ao oxigênio dissolvido, Braum et al. (2006) investigaram que o jundiá tolera baixas concentrações, sendo que a concentração letal em 96 h ( $CL_{50-96h}$ ) para o oxigênio dissolvido foi  $0,52 \text{ mg.L}^{-1}$  (IC  $0,42-0,61 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os juvenis expostos a  $0,40-1,04 \text{ mg.L}^{-1}$  de oxigênio dissolvido freqüentemente nadavam próximos à superfície, exibindo perda de equilíbrio, aumento de movimentos operculares e subsequente morte. Os autores verificaram também que utilizando concentrações de 1,96; 3,10; 4,10; 5,20 e 6,16 mg/L, o melhor desempenho em relação ao crescimento (comprimento padrão, massa, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e biomassa) ocorreu na concentração  $5,20 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Para a dureza, TOWNSEND ET AL.. (2003) verificaram que níveis de dureza entre  $30$  e  $70 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  promoveram um bom crescimento e ganho de biomassa para larvas de jundiá. Nesse trabalho, os maiores níveis de dureza ( $300$  e  $600 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) causaram baixa sobrevivência ( $1,0 \pm 0,8$  e  $0,3 \pm 0,3\%$  respectivamente) das larvas no primeiro dia, enquanto que em larvas mantidas em  $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  a sobrevivência ficou em  $8,7 \pm 0,9\%$  durante a primeira semana de experimento. As larvas expostas a  $30 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  apresentaram maiores taxas de sobrevivência ( $80,4 \pm 4,1\%$ ).

A  $CL_{50-96h}$  da amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) foi determinada para o jundiá em diferentes níveis de pH (6,0; 7,5 e 8,0) confirmando a correlação entre a amônia não ionizada e pH da água. A  $CL_{50-96h} \text{ NH}_3$  estimada nos pHs 6,0; 7,5 e 8,2 foi equivalente a 0,44; 1,45 e  $2,09 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Nesses experimentos concluiu-se que em pH 8,2 alevinos de jundiá têm sua sobrevivência prejudicada em níveis acima de 5% da  $CL_{50-96h}$  e seu crescimento diminuído com níveis acima de 10% da  $CL_{50-96h}$  (MIRON, 2004; MIRON ET AL., in press).

O jundiá é uma espécie que tem despertado grande interesse em piscicultores e pesquisadores, de modo que já existe uma trajetória de pesquisa buscando desenvolver tecnologias que viabilizem sua exploração e máximo desempenho no cultivo. Dentre os bagres, o jundiá apresenta grande potencial para

a aqüicultura na Região Sul, por ser uma espécie que apresenta rápido crescimento, mesmo nas baixas temperaturas observadas no inverno na região sul, reproduzindo-se praticamente ao longo de todo o ano, com exceção dos meses mais frios (junho a agosto), sendo uma espécie apropriada para a produção em regiões onde o clima temperado e subtropical é predominante (BARCELLOS ET AL., 2003). Em culturas intensivas, no sistema de monocultivo em gaiolas, apresenta alta sobrevivência (90-100%) e peso final de  $63,74 \pm 3,69$  g após três meses de cultivo (BARCELLOS ET AL., 2004). Entretanto, existem ainda fatores a serem superados para efetivar o potencial dessa espécie, a qual apresenta uma boa produtividade em viveiros e aceitabilidade no mercado consumidor.

Esse trabalho verificou a influência da qualidade da água na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá, bem como a eficiência do  $\text{Ca}^{2+}$  para minimizar os possíveis efeitos nocivos. Os parâmetros avaliados, níveis de amônia, oxigênio dissolvido,  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta e na água, estão relacionados a situações comuns vivenciadas pelos produtores e que podem determinar a viabilidade da atividade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Testar o efeito da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na ração e na água na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes níveis de amônia e oxigênio dissolvido.

### 2.2 Objetivos Específicos

\* Verificar a eficácia da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na ração sobre a concentração letal 96h ( $\text{CL}_{50-96h}$ ) da amônia ( $\text{NH}_3$ ) e do oxigênio dissolvido ( $\text{O}_2$ ) em juvenis de jundiá.

\* Verificar a eficácia da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na água sobre a  $\text{CL}_{50-96h}$  da  $\text{NH}_3$  e do  $\text{O}_2$  em juvenis de jundiá.

\* Verificar a eficácia da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na água sobre o efeito da  $\text{NH}_3$  e do  $\text{O}_2$  na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá em condições de laboratório.

Esta tese foi organizada em forma de capítulos contendo introdução e objetivos gerais, seguidos do Capítulo 1, como o capítulo "Diet and Osmoregulation"

Ferreira, F. and Baldisserotto, B., do livro “*Fish Osmoregulation*” de Baldisserotto, B.; Mancera, J.M.; Kapoor, B.G. Eds. Enfield, USA: Science Publisher, 2007. O Capítulo 2 refere-se ao artigo “Survival and growth of silver catfish *Rhamdia quelen* juveniles exposed to NH<sub>3</sub> levels and different levels of dietary and waterbourne Ca<sup>2+</sup>” e o Capítulo 3, é referente ao artigo “Sobrevivência e crescimento de juvenis de jundia *Rhamdia quelen* expostos a diferentes níveis de O<sub>2</sub> e de Ca<sup>2+</sup> na dieta e na água”. Como uma síntese do trabalho a tese foi finalizada com uma conclusão geral e considerações finais.

## CAPITULO 1 DIET AND OSMOREGULATION

Francesca W. Ferreira<sup>1</sup> and Bernardo Baldisserotto<sup>2</sup>

1- Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, 98700.000 – Ijuí, RS, Brazil

2 - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil

### INTRODUCTION

Fish adapted to freshwater and waters with low salinity present a diffusive ion loss to the environment via gills and skin, as well as by feces and urine. This ion loss must be compensated by an active influx from the water by the gills (Wood, 2001), from the diet by the intestine (Dabrowski et al., 1986; Buddington and Diamond, 1987; Bogé et al., 1988; Baldisserotto et al., 1993; Baldisserotto and Mimura, 1995a; Kerstetter and White, 1994; Bijvelds et al., 1998), and in some species as the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, it might be also complemented by the skin (Stiffler et al., 1986). Another complicating factor in freshwater fishes is that most studies of *in vitro* intestinal absorption/transporters were done with fasting fishes. Feeding drastically changes the ionic situation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, intestine (Dabrowski et al., 1986), and the addition of several amino acids or glucose to the mucosal side of the medium bathing to intestines *in vitro* increases the flow of Na<sup>+</sup> toward the serosal side in various teleosts species (Ferraris and Ahearn, 1984; Vilella et al., 1988, 1989; Bogé and Péres, 1990). In addition, intestinal Ca<sup>2+</sup> absorption is affected by the diet (Baldisserotto et al., in press).

The drinking rate of freshwater teleosts is low (370-1400  $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (see Flik et al., 1985), but the intestine (or the pyloric ceca, when present) can absorb Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> (and probably other ions) provided by feeding (Dabrowski et al., 1986; Buddington and Diamond, 1987; Bogé et al., 1988; Baldisserotto et al., 1993; Baldisserotto and Mimura, 1995a; Kerstetter and White, 1994; Bijvelds et al., 1998). Therefore, diet can be an important ion source for osmoregulatory needs of fish living

in hyposaline environments. Dietary salt supplementation can also decrease energy spent on osmoregulation and consequently more will be available for growth (Gatlin et al., 1992; D'Cruz and Wood, 1998).

On the other hand, fish that live in waters with high salinity have problems of excessive ion influx, which must be eliminated by the gills and urine. The digestive tract absorbs ions, but the aim of this process is to provide absorption of the ingested water and not ions from the diet (Kirsch et al., 1984). Therefore, present chapter will deal mainly with the contribution of the diet to osmoregulation of fish adapted to low salinities. Moreover, emphasis will be on direct effects of dietary composition on osmoregulation and not indirect effects (morphological changes) due to lack of specific nutrients as vitamins, for example.

### **Dietary Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>**

Rainbow trout can survive for long fasting periods without a significant decrease on blood Na<sup>+</sup> concentration (Heming and Paleczny, 1987), and consequently Na<sup>+</sup> branchial influx is adequate to maintain ionic balance in fish even when food consumption (and consequently dietary Na<sup>+</sup> intake) is low, as in winter (Smith et al., 1989). However, intestinal influx of dietary Na<sup>+</sup> in rainbow trout collected from the wild in summer is similar to branchial influx (Smith *et al.*, 1989). Apparently most dietary Na<sup>+</sup> ingested is absorbed by the gut (Salman, 1987, Smith *et al.*, 1995), because feces have a low amount of salts even in rainbow trout fed with high salt content in the diet (Salman and Eddy, 1988). Rainbow trout fed high NaCl diets (1.8 and 3% Na<sup>+</sup>) showed a decrease of 40.8 and 44.0% on waterborne Na<sup>+</sup> whole body uptake rates relative to controls (diet with 0.6% Na<sup>+</sup>). Moreover, Na<sup>+</sup> efflux was 12% and 38% higher in fish fed 1.8% and 3% sodium-enriched diets, respectively. The increase of plasma Na<sup>+</sup> concentration due to high dietary Na<sup>+</sup> (38.1% in fish fed with 3% sodium-enriched diet) (Figure 1) probably causes a downregulation of a branchial uptake route through an apical sodium channel, which reduces waterborne Na<sup>+</sup> uptake. Fish fed high-sodium diets (3%) also drank 58% more water than controls (Pyle et al., 2003). This increase on drinking rate is needed to counterbalance the increase on plasma Na<sup>+</sup> concentration (Salman & Eddy, 1988).



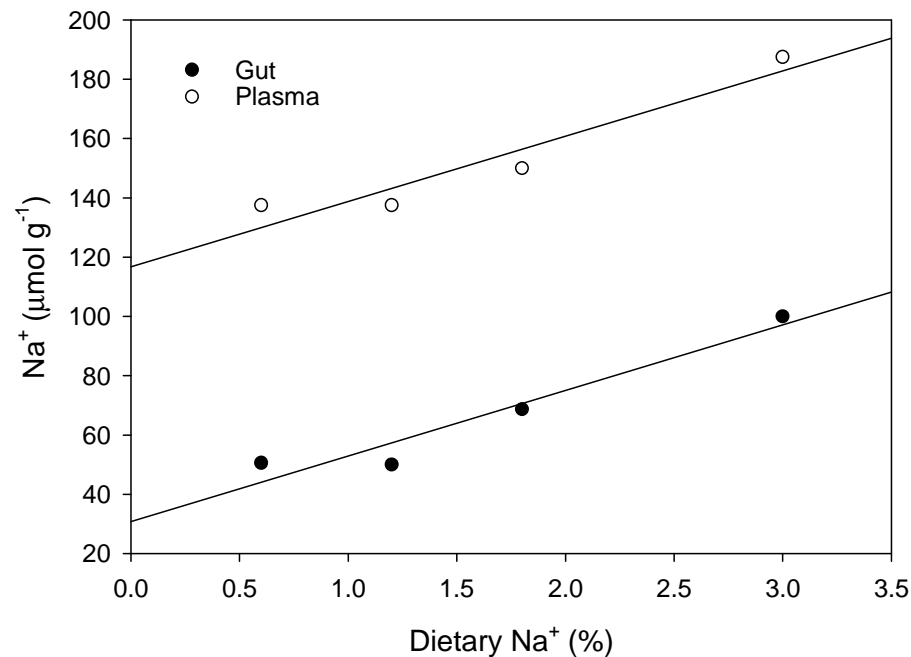


Figure 1 – Total Na<sup>+</sup> levels in gut tissue and plasma of rainbow trout fed for 7 days with different Na<sup>+</sup> levels in the diet (and also exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> waterborne Cu for 6 h). Adapted from Pyle et al. (2003).

An increase of dietary NaCl from 2 to 12% in rainbow trout promoted a two-fold increase of the number of chloride cells in the gills and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity (Salman and Eddy, 1987). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the proximal intestine (pyloric ceca and anterior intestine) was also stimulated by Na<sup>+</sup>-supplemented diets in rainbow trout (Pyle et al., 2003), but not in bluegill, *Lepomis macrochirus* (Musselman et al., 1995). The proportion of chloride cells related to total branchial cells also increased from 8% in rainbow trout fed with 1.3% dietary salt, to 10.5% in fish fed with 12% dietary NaCl (Salman and Eddy, 1987). High dietary NaCl (11.6%) did not alter the typical freshwater renal mechanism in rainbow trout, where the majority of filtered ions are reabsorbed to produce a relatively large volume of dilute urine. However, there was an increase on glomerular filtration rate and urinary flow rate, which approximately doubled Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> urinary excretion rate. Even with this increase of salt urinary excretion rate, salt renal excretion represented only 10% of the total body loss and is similar to fecal salt loss (Salman and Eddy, 1988). Increase of drinking rate (Pyle et al., 2003), gill water permeability and intestinal water absorption would provide the water needed for this increase of urinary flow rate (Salman and Eddy, 1988).

The principal mechanism for Na<sup>+</sup> homeostasis is the variation on branchial Na<sup>+</sup> influx and efflux rates, and the main way of excreting large salt loads is to increase Na<sup>+</sup> branchial efflux (Smith et al., 1995; Pyle et al., 2003). In rainbow trout fed on freshwater shrimp *Gammarus pulex* 60% of the ingested Na<sup>+</sup> was absorbed within 5 h (Smith et al., 1989). Similarly, rainbow trout receiving a commercial diet supplemented with 12% NaCl constituted a mean Na<sup>+</sup> load of 36.2 mmol.kg fish<sup>-1</sup>, of which around 85% was absorbed within 7 h (maximum time of the experiment). Absorption from the gut increased Na<sup>+</sup> plasma levels compared with levels in unfed fish, and within 1 h, branchial Na<sup>+</sup> efflux increased and remained high for 7 h, indicating that excretion of excess Na<sup>+</sup> was not complete at the end of this period (Smith et al., 1995). Blood Cl<sup>-</sup> levels were unchanged in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fed a NaCl load of 15.3 mmol.kg fish<sup>-1</sup>, but ingestion of 46 mmol.kg fish<sup>-1</sup> increased blood Cl<sup>-</sup> levels up to 40% above control values 7 h after feeding. Blood Cl<sup>-</sup> levels returned to control values after 24 h, but ingestion of higher NaCl load (77 mmol.kg fish<sup>-1</sup>) led to a prolonged increase in blood Cl<sup>-</sup> levels and in many cases, death (Phillips, 1944). Plasma Cl<sup>-</sup> levels in bluegill maintained in freshwater and fed diet supplemented with 2 or 4% NaCl were also higher than in fish kept in freshwater and fed a diet without NaCl supplementation (Musselman et al., 1995).

In acidic water, excess H<sup>+</sup> can inhibit the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (Potts, 1994) and create a gradient too steep for further extrusion of protons (Lin and Randall, 1991), reducing Na<sup>+</sup> uptake by the gills. Moreover, high H<sup>+</sup> concentrations disrupt the tight junctions of gill epithelia, increasing ion loss by a paracellular route, leading to whole body ion loss, as observed in rainbow trout (McDonald and Wood, 1981) and silver catfish, *Rhamdia quelen* (Zaions and Baldisserotto, 2000). Under these conditions, dietary salts may become very important in maintaining body ion levels during acid stress (D'Cruz and Wood, 1998). Starved fish (or fed with a very limited diet) showed ionoregulatory changes during exposure to acidic environment (D'Cruz et al., 1998), but when they were fed with adequate amount of salts the effect of low pH was reduced or did not occur (Dockrey et al., 1996; D'Cruz et al., 1998). Therefore, dietary salt can replace branchial ion loss (D'Cruz and Wood, 1998).

Some studies proposed that acidic pH may impair growth in rainbow trout due to a decrease on food consumption (see D'Cruz and Wood, 1998), as was observed in silver catfish (Copatti et al., 2005). However, Dockray et al. (1996), Reid et al. (1996, 1997) and D'Cruz et al. (1998) verified that chronic exposure of rainbow trout to low

pH seemed to stimulate appetite. Rainbow trout exposed to acidic pH for 28 days and starved showed significantly lower plasma  $\text{Na}^+$  (but not whole body  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$ ) than before acid challenge. Those fed with a low NaCl diet (0.1-0.18%), independently of energy content, also presented a decrease on plasma  $\text{Na}^+$  and whole body  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  (the last, only the low energy diet), but fish fed with 0.6% NaCl did not show any ionic imbalance. Therefore, is the salt content of the food rather than the energy content that is critical in protecting against the effect of acidic pH (D'Cruz and Wood, 1998).

An adequate dietary  $\text{Na}^+$  level could have lower metabolic cost associated with active branchial ion transport, and the saved energy could be used for growth (Smith et al., 1989). Atlantic salmon (*Salmo salar*) has a whole body  $\text{Na}^+$  content of 25 mmol/kg (Talbot et al., 1986), so Smith et al. (1989) estimated that a 10 g fish (whole body  $\text{Na}^+$  content of 0.25 mmol) doubling in weight over a year would need 0.25 mmol  $\text{Na}^+$ . According to the same authors, this amount is easily obtained by feeding and branchial uptake because total  $\text{Na}^+$  influx in rainbow trout in June is over 1000 times greater. It must also be considered that branchial  $\text{Na}^+$  fluxes may be rapidly adjusted to diet changes (Smith et al., 1995), and therefore, a high  $\text{Na}^+$  diet might not improve growth in rainbow trout in optimum water conditions. However, when fish are exposed to acidic pH branchial ion influx is lower and the efflux is higher than in neutral waters, and dietary salt supplementation may help to maintain ionic balance (D'Cruz and Wood, 1998).

Salinity has variable effects on growth of euryhaline species, and growth is not necessarily maximal at isosmotic conditions (Brett, 1979; Musselman et al., 1995; Likongwe et al., 1998). Red drum (*Sciaenops ocellatus*) is commonly found in waters with 20 – 40‰, and juveniles growth is improved in freshwater with a diet supplemented with 2% NaCl or 2% NaCl + 2% KCl. However, NaCl dietary supplementation did not change growth in juveniles exposed to brackish (6‰) and sea water (35‰) neither blood osmolality of fish maintained in fresh or brackish water and transferred to seawater. These results suggest that salinity of 6‰ may be close to the threshold at which dietary salt supplementation promotes growth in red drum (Gatlin III et al, 1992). Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) fed diets supplemented with 7% NaCl or 5% NaCl + 2% KCl showed higher tolerance to seawater transfer (Zaugg et al., 1983). Diets supplemented with 10% NaCl also improved survival to seawater transfer of two tilapia species (*Oreochromis*

*mossambicus* and *Oreochromis spilurus*) and the hybrid *Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus* (Al-Amoundi, 1987), as well as brown trout (*Salmo trutta*) (Arzel et al., 1993). Nile tilapia (*O. niloticus*) maintained in freshwater and fed diet supplemented with 8% NaCl for 30 days showed higher growth rate than those fed diet without NaCl supplementation, while dietary NaCl did not change significantly growth rate in fish kept in brackish water (10 and 20‰) (Fontainhas-Fernandes et al., 2002). However, Nile tilapia fed diet with 8% NaCl presented significantly lower plasma Cl<sup>-</sup> and osmolarity after transference to brackish water than those fed diet without NaCl supplementation, indicating a reduction of osmotic imbalance (Fontainhas-Fernandes et al., 2001).

### **Dietary Ca<sup>++</sup>**

Fish take up calcium for growth and homeostasis predominantly by the gills, directly from the water. This branchial Ca<sup>2+</sup> uptake is an active and a more or less continuous process and largely independent of waterborne Ca<sup>2+</sup> (Flik, 1996). Fish also take up Ca<sup>2+</sup> from food or water drunk by the intestine (Flik, 1993; Flik and Verbost, 1995), but under normal, no stressed conditions, the drinking rate of freshwater fish is very low, and the contribution of the intestine to Ca<sup>2+</sup> uptake is restricted to dietary calcium (Flik, 1995). The ratio between Ca<sup>2+</sup> gained from water and from food, and thus the contribution of gills and intestine to Ca<sup>2+</sup> uptake, is variable and depends on waterborne and dietary Ca<sup>2+</sup> concentration. In fish exposed to low waterborne Ca<sup>2+</sup> the relative contribution of the food increases, whereas feeding low-Ca<sup>2+</sup> diets stimulates branchial uptake. There is also evidence that fish rely on Ca<sup>2+</sup> intestinal uptake when extensive amounts of Ca<sup>2+</sup> are required for gonadal maturation (Flik et al., 1995). A total lack of dietary Ca<sup>2+</sup> can be completely compensated by branchial uptake, but very low waterborne Ca<sup>2+</sup> induces hypocalcemia and impairs growth (Shoenmakers et al., 1993; Flik, 1996).

Low waterborne (0.125 mmol) and dietary Ca<sup>2+</sup> reduced growth rate in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) (Rodgers, 1984), demonstrating that a minimum Ca<sup>2+</sup> uptake by gills and/or intestine is needed for normal fish growth. Channel catfish (*I. punctatus*) reared in low waterborne Ca<sup>2+</sup> (< 0.25 mmol) required 4.5 mg Ca<sup>2+</sup>g<sup>-1</sup> food for normal growth and tissue mineralization (Robinson et al., 1986) while blue tilapia (*Oreochromis aureus*) reared in similar conditions fed with 7.5 mg Ca<sup>2+</sup>g<sup>-1</sup> food

showed higher bone and scale  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (but only higher scale  $\text{Mg}^{2+}$  concentration and bone phosphorus concentration) than those fed with diet deprived of  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Connell and Gatlin, 1994) (Figure 2). Striped bass (*Morone saxatilis*) juveniles maintained at 0.68 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  presented high whole body waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  uptake compared to other teleosts, but still much lower than the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  assimilation necessary for optimum growth of this species (Grizzle et al., 1993). However, dietary  $\text{Ca}^{2+}$  was dispensable for rainbow trout when waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  was above 0.6 mmol (Ogino and Takeda, 1978), and  $\text{Ca}^{2+}$ -supplemented diets from 3.6 to 11 mg  $\text{Ca}^{2+}\text{g}^{-1}$  food did not change growth of this species when reared at water with 0.75 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  (Barnett et al., 1979).

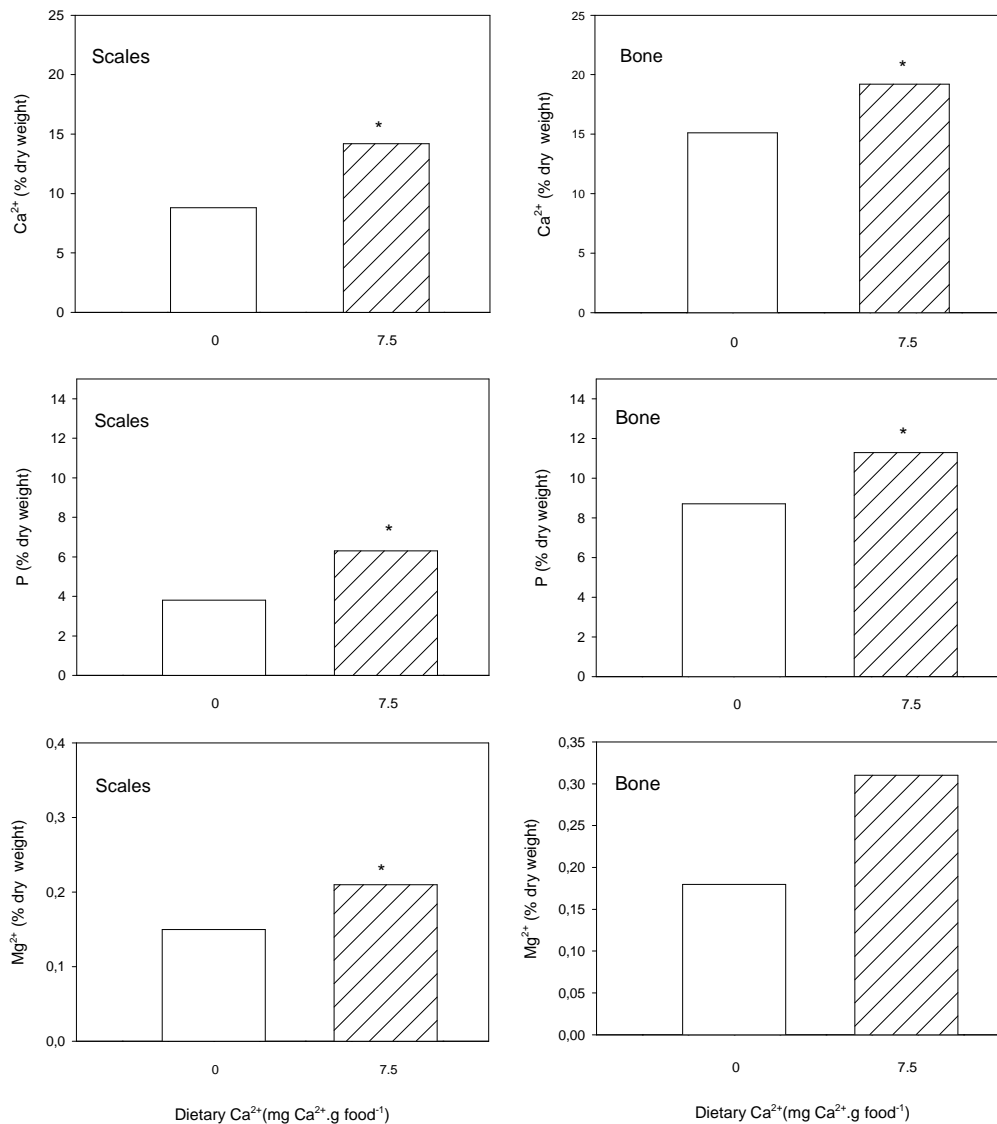


Figure 2 - Calcium,  $\text{Mg}^{2+}$  and P concentrations in scales and bone of blue tilapia fed with diets with different  $\text{Ca}^{2+}$  levels for 24 weeks. Data from O'Connell and Gatlin (1994).

\* significantly different from 0 mg  $\text{Ca}^{2+}$  g food<sup>-1</sup> by ANOVA ( $P < 0.05$ )

Rainbow trout maintained at waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  1 mmol fed high dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels (60 mg  $\text{Ca}^{2+}\text{g}^{-1}$  food) showed 52-64% lower whole body waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  uptake compared to fish fed with lower dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels (20 mg  $\text{Ca}^{2+}\text{g}^{-1}$  food) (Baldisserotto et al., 2004 a, b). A diet supplemented with  $\text{CaCl}_2$  to yield 30 mg  $\text{Ca}^{2+}\text{g}^{-1}$  food did not change rainbow trout growth, but a higher dietary level of  $\text{CaCl}_2$  (60 mg  $\text{Ca}^{2+}\text{g}^{-1}$  food) led to 21.6% mortality and decreased weight gain. The deaths observed in the treatment with a high amount of  $\text{CaCl}_2$  probably were due to metabolic acidosis and/or to a sharp increase on  $\text{Ca}^{2+}$  plasma levels seen after the first feeding with this diet (Baldisserotto et al.(2004a) (Figure 3). However, in rainbow trout fed the same dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels but supplemented with  $\text{CaCO}_3$  mortality was not observed (Baldisserotto et al., 2004b). Therefore supplementation with  $\text{CaCO}_3$  seems to be safer than with  $\text{CaCl}_2$ .

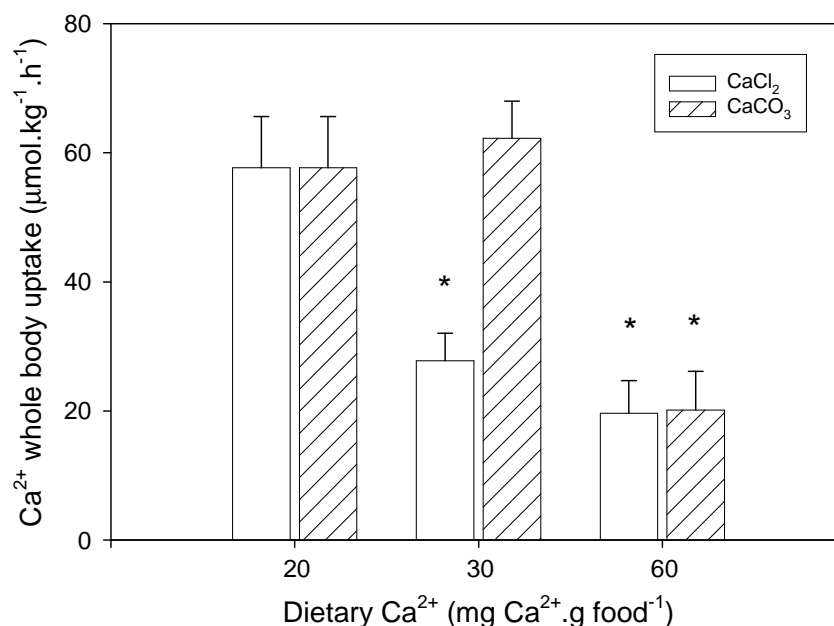


Figure 3 -  $\text{Ca}^{2+}$  (A) whole body uptake of rainbow trout exposed to diets with different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Means  $\pm$  1 SEM (N = 8–9). Adapted from Baldisserotto et al. (2004a, b).

\* significantly different from 20 mg/g  $\text{Ca}^{2+}$  by One-way ANOVA and Tukey test ( $P < 0.05$ )

Fishes adapted to seawater drink water with a high  $\text{Ca}^{2+}$  content (approximately 10 mmol/L), and do not decrease branchial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, which suffices for growth and homeostasis. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  intestinal absorption is greatly reduced compared to freshwater fishes, and this reduction is correlated with a

decrease in the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  transporters in the enterocyte plasma membrane (Flik and Verbost, 1993).

### **Dietary Phosphorus**

In addition to being a major constituent of structural components of skeletal tissues, phosphorus is located in every cell of the body. It is an important constituent of nucleic acids and cell membranes and is directly involved in all energy-producing reactions of the cell. It plays an important role on carbohydrate, lipid and amino acid metabolism and in muscle and nervous tissues metabolism, as well as on various metabolic processes involving buffers in body fluids. The phosphate metabolism of fish has not been as well studied as that of  $\text{Ca}^{2+}$ . Food is the main source of phosphorus because phosphate concentrations are low in both freshwater and seawater (approximately  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ). The uptake of phosphorus from water has been repeatedly demonstrated (Lall, 1989). The absorption of dietary phosphorus is affected by the level of phosphate in the blood. Phosphorus accumulates mainly in soft tissues (heart, liver, kidney, and blood) and to a limited extent in skeletal tissues (Mol et al., 1999). Many studies with monogastric animals have shown that an optimum dietary  $\text{Ca}^{2+}$ /phosphorus ratio is important: an increase of dietary  $\text{Ca}^{2+}$ /phosphorus ratio interferes with phosphorus absorption, and conversely, a high  $\text{Ca}^{2+}$ /phosphorus ratio may restrict  $\text{Ca}^{2+}$  absorption. Although the magnitude of effect changes with species and forms of  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphorus present in the diet, such studies on  $\text{Ca}^{2+}$ /phosphorus ratio in fish diet are limited (Lall, 1989).

### **Dietary $\text{Mg}^{2+}$**

In fish, as in all vertebrates,  $\text{Mg}^{2+}$  is found mineralized in bony tissues as an ionized form ( $\text{Mg}^{2+}$ ) or complexed with proteins in all tissues (Bijvelds et al., 1998). The magnesium pool of bones and scales may be used as a reserve to maintain normal  $\text{Mg}^{2+}$  levels in soft tissues when  $\text{Mg}^{2+}$  intake is low (Bijvelds et al., 1996). Of the remaining  $\text{Mg}^{2+}$  pool in the soft tissues, only a small percentage is found in the extracellular fluid. The total  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of blood plasma in most cases does not exceed  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ , and the ionic concentration is normally less than  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (Bijvelds et al., 1997). The ionic  $\text{Mg}^{2+}$  level in the cytoplasm is kept relatively low, i.e.,

in the submillimolar range, typically representing less than 10% of total  $Mg^{2+}$  content to the cell (Bijvelds et al., 1998).

As  $Mg^{2+}$  plays an important role in cell, and intracellular and extracellular  $Mg^{2+}$  levels are maintained within narrow limits, vertebrates must have developed effective mechanisms by which  $Mg^{2+}$  is transported, stored and its concentration regulated. However, transport of  $Mg^{2+}$  across intestinal and kidney epithelia, key process to the understanding of  $Mg^{2+}$  regulation, is still poorly understood. The mechanism of branchial  $Mg^{2+}$  uptake has not been demonstrated (Bijvelds et al., 1998). Freshwater fish are threatened by diffusive losses of  $Mg^{2+}$  across the body surfaces because  $Mg^{2+}$  concentration in freshwater is typically well below  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ . These losses have to be compensated for by  $Mg^{2+}$  uptake from the diet and from the water. Renal excretion must be limited by reabsorption of filtered  $Mg^{2+}$  (Bijvelds et al., 1998).

The hydrolytic activity of ATPase is described as  $Mg^{2+}$  dependent. ATPase affects the utilization of stored energy from ATP which is required for excretion or intake of ions across the gill membranes against a concentration gradient. The increased branchial ATPase activity during smoltification has made this an indicator enzyme in monitoring the hyposmotic regulation ability in salmonids. The activity of  $Mg^{2+}$ ATPase in renal tissue shows positive correlation with branchial ATPase activity during smoltification and may be involved in  $Mg^{2+}$  excretion. The concentration of  $Mg^{2+}$  in freshwater differs widely from that in sea water, and dietary  $Mg^{2+}$  fed in the freshwater phase possibly affects the regulatory ability of  $Mg^{2+}$  in salmon transferred to seawater (El-Mowafi, 1997).

In freshwater fish that depend primarily on diet for their  $Mg^{2+}$  uptake, optimal growth is usually achieved when dietary  $Mg^{2+}$  is  $15 - 20 \text{ mmol kg}^{-1}$ . Prolonged feeding with lower dietary  $Mg^{2+}$  content may lead to a decrease in growth rate,  $Mg^{2+}$  depletion of the tissues, muscle dysfunction, neurological disorders and high mortality (Bijvelds et al., 1996). A low dietary  $Mg^{2+}$  intake induced high body  $Ca^{2+}$  levels in rainbow trout (Cowey et al., 1977), tilapia (*O. niloticus* and *O. mossambicus*) (Dabrowski et al., 1989; Bijvelds et al., 1997a) and guppy (*Poecilia reticulata*) (Shim and Ng, 1988). Magnesium affects the permeability of the intestinal epithelium to ions (Fordtran et al., 1985) and low luminal  $Mg^{2+}$  concentration therefore increases epithelial permeability to ions, possibly stimulating paracellular  $Ca^{2+}$  absorption (Karbach and Feldmeier, 1991). Minutes perturbations to cellular  $Mg^{2+}$  homeostasis



affects the acid-base regulation of the cells involved in bone formation, and this may lead to supersaturation of plasma  $\text{Ca}^{2+}$ , resulting in spontaneous calcification process in soft tissues (Driessens et al., 1987). In line with this hypothesis, calcification of renal tissue occurred in  $\text{Mg}^{2+}$ -deficient rainbow trout (Cowey et al., 1977).

It has been suggested that, in  $\text{Mg}^{2+}$ -deficient rainbow trout, the increase in muscle  $\text{Na}^+$  content was due to a decrease in cell water content coupled with an increase in extracellular volume (Cowey et al., 1977; Bijvelds et al., 1998). Such changes in the mineral status and water content of tissues are suggestive of changes in cell membrane permeability that could cause an increase turnover. The action of  $\text{Mg}^{2+}$  on the fluidity of cellular membranes may underlie this phenomenon. The permeability of osmoregulatory epithelia may also be affected since it has been demonstrated that external  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  levels influence gill permeability to both water and ions (Wendelaar Bonga et al., 1993; Bijvelds et al., 1996a; 1998). It is plausible that this relationship reflects the dependence of cellular ion transport mechanisms, such as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Rude, 1989), the  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  symporters (Flatman, 1988) and cations channels (Horie et al., 1987; Dorop and Clausen, 1993; Bijvelds, 1998) on  $\text{Mg}^{2+}$ . Moreover,  $\text{Mg}^{2+}$  may influence ion movement across cellular membranes through its action on membrane permeability (Bijvelds et al., 1998).

Internally,  $\text{Mg}^{2+}$  may have similar actions on membrane permeability and ion turnover in osmoregulatory organ such as the gills. For instance, in Mozambique tilapia low dietary  $\text{Mg}^{2+}$  caused proliferation of branchial chloride cells (Bijvelds et al., 1996a), and decrease  $\text{Na}^+$  influx across the gills (Van der Velden et al., 1992b). Such changes are indicative of an increased turnover of these cells in the gill epithelium. Renewal branchial epithelium may be a response to disturbance in ion transport across the gills, since both the epithelial permeability to ions and water (Wendelaar Bonga et al., 1993) and the activity of cellular ions transporters (Flatman, 1993) are controlled by  $\text{Mg}^{2+}$  (Bijvelds et al., 1997). Furthermore, in common carp (*Cyprinus carpio*)  $\text{Mg}^{2+}$  deficiency is associated with changes in branchial ion regulation (an increase in opercular chloride cell density and a decrease in branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity) that coincide with an increased bone  $\text{Na}^+$  content (Van der Velden et al., 1992a).

Fresh water fish depend on  $Mg^{2+}$  absorption from the intestinal tract to meet most of their  $Mg^{2+}$  requirement (Van der Velden et al., 1992a; 1992b). It is widely recognized that the intestine is the most important route for  $Mg^{2+}$  uptake in freshwater fish (Gatlin et al, 1992; Shearer and Asgard, 1992). At low dietary  $Mg^{2+}$  levels, absorption of this ion is highly efficient, suggesting a regulated intestinal  $Mg^{2+}$  transport route. In this condition, urinary  $Mg^{2+}$  excretion decreased, and this suggests that tubular reabsorption is increased. As renal and intestinal epithelial cells maintain a large potential difference (inside negative) across the plasma membrane, an active extrusion mechanism is indicated, both to maintain the low intracellular  $Mg^{2+}$  concentration and to allow transcellular  $Mg^{2+}$  transport (Bijvelds et al., 1996a).

## Acknowledgements

B. Baldisserotto received a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil) research grant.

## References

- Al-Amoudi, M.M. 1987. The effects of high salt diet on the direct transfer of *Oreochromis mossambicus*, *O. siplurus*, *O. niloticus* hybrids to sea water. Aquaculture 64:333-338.
- Arzel, J., R. Metailler, G. Boeuf, F. Baudin-Lauencin, H. Barone and J. Guillaume. 1993. Effect of high extra dietary sodium chloride in *Salmo trutta* on transfer to seawater. In: S.J. Kaushik and P. Luquet (eds.), Fish Nutrition in Practice. IV Int. Symposium Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, 24-27 jun 1991, INRA, pp. 903-906.
- Baldisserotto, B. 2003. Osmoregulatory adaptations of freshwater teleosts. In: A.L. Val and B.G Kapoor (eds.). Fish Adaptations. Science Publishers, Inc, Enfield, pp 179-201.
- Baldisserotto, B., O.M. Mimura and L.C. Salomão. 1993. Effect of pH on ion and water transport in the gut of freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. Ciência e Cultura 45:396-398.
- Baldisserotto, B. and Olga M.Mimura. 1995a. Ion and water transport in the gut on the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. Ciência e Cultura 47: 83 –85.
- Baldisserotto, B., C. Kamunde, A.Y.O. Matsuo and C.M. Wood. 2004a. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. Aquatic Toxicology 67: 57-73.

- Baldisserotto, B., C. Kamunde, A.Y.O. Matsuo and C.M. Wood. 2004b. Acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout is reduced by dietary calcium carbonate. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 137: 363-372.
- Baldisserotto, B., M.J. Chowdhury and C.M. Wood. *in press*. In vitro analysis of intestinal absorption of cadmium and calcium in rainbow trout fed with calcium- and cadmium-supplemented diets. Journal of Fish Biology.
- Bijvelds, M.J.C., G. Flik, Z. Kolar, Z. and S.E. Wenderlaar Bonga. 1996a. Uptake, distribution and excretion of magnesium in *Oreochromis mossambicus* dependence on magnesium in diet and water. Fish Physiology and Biochemistry 15: 287-298.
- Bijvelds, M.J.C., Z. Kolar, S.E. Wenderlaar Bonga and G. Flik. 1996b. Magnesium transport across the basolateral plasma membrane of fish enterocyte. Journal of Membrane Biology 154: 217-225.
- Bijvelds, M.J.C., Z. Kolar and S.E. Wenderlaar Bonga. 1997a. Mineral balance in *Oreochromis mossambicus*: dependence on magnesium in diet and water. Fish Physiology and Biochemistry 16: 323-331.
- Bijvelds, M.J.C., Z. Kolar, S.E. Wenderlaar Bonga and G. Flik. 1997b. Magnesium transport in plasma membrane vesicles of renal epithelium of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Experimental Biology 200: 1931-1939.
- Bijvelds, M.J.C., J.A. Van Der Velden, Z. Kolar and G. Flik. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. Journal of Experimental Biology 201: 1981-1990.
- Bogè, G. and G. Pérès. 1990. Chlorid requirements of sodium cotransporter systems. In: R.K.H. Kinne (ed.). Comparative aspects of sodium cotransport systems. Comparative Physiology 7: 186-215.
- Bogè, G., L. Lopes and G. Pérès. 1988. An *in vivo* study of the role of pyloric caeca in water absorption in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology 91(1): 9-13.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett (eds.). Fish Physiology. v. VIII – Bioenergetics and growth. Academic Press, New York, pp.599-675.
- Buddigton, R.K., J.W. Chen and J. Diamond. 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. Journal of Physiology 393: 261-281.
- Copatti, C.E., I.J. Coldebella, J. Radünz Neto, L.O. Garcia, M.C. Rocha, M.C. da and B. Baldisserotto. 2005. Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH. Aquaculture Nutrition, 11: 345-350.
- Cowey, C.B., D. Knox, J.W. Adron, S. George and B. Pirie. 1977. The production of renal calcinosis by magnesium deficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition 38: 127-135.
- Dabrowski, K., C. Leray, G. Nonnotte and D.A. Colin. 1986. Protein digestion and ion concentration in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) digestive tract in sea and freshwater. Comparative Biochemistry and Physiology 83A: 27-39.

- Dabrowska, H., K.H. Meyer-Burgdorff and K.D. Günther. 1991. Magnesium status in freshwater fish, common carp (*Cyprinus carpio*, L.) and dietary protein-magnesium interaction. Fish Physiology and Biochemistry 9: 165-172.
- D'Cruz, L.M. and C.M. Wood. 1998. The influence of dietary salt and energy on the response to low pH in juvenile rainbow trout. Physiological Zoology 71 (6): 642-657.
- D'Cruz, L.M., J.J. Dockray, I.J. Morgan and C.M. Wood. 1998. Physiological effects of sublethal acid exposure in juvenile rainbow trout on a limited ration during a simulated global warming scenario. Physiological Zoology 71: 359-376.
- Dockray, J.J., S.D. Reid and C.M. Wood. 1996. Effects of elevated summer temperatures and reduces pH on metabolism and growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on unlimited ration. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 25: 2752 -2763.
- Driessens, F.C.M., R.M.H. Verbeck, J.W.E. Van Dijk and J.M.P.M. Borggreven. 1987. Response of plasma calcium and phosphate to magnesium depletion. A review and its physiological interpretation. Magnesium Bulletin 9: 193-201.
- Dorop, I. and T. Clausen. 1993. Correlation between magnesium and potassium contents in muscle: role of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump. American Journal of Physiology 204: C457-C463.
- El-Mowafi, A.F.A., R. Waagbo and A. Maage. 1997. Effect of low magnesium on immune response and osmoregulation in Atlantic salmon. Journal of Aquatic Animal Health 9 (1): 8 – 17.
- Ferraris, R. and G.A. Ahearn. 1984. Sugar and aminoacid transport in fish intestine. Comparative Biochemistry and Physiology. 77A (3):397-413.
- Flatman. P.W. 1993. The role of magnesium in relating ion transport. In: Magnesium and the Cell. N.J. Buich (ed.). Academic Press, London, pp.197-216.
- Flik, G., J.H. Van Rijs and S.E. Wendelaar Bonga. 1985. Evidence for high-affinity Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and ATP-driven Ca<sup>2+</sup> transport in membrane preparations of the gill epithelium of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Experimental Biology 119: 335-347.
- Flik, G., J.A. Van Der Velden, K.J. Dechering, J.M. Verbost, J.M.T.H. Schoenmakers, Z.I. Kolar, and S.E. Wendelaar Bonga. 1993. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. Journal of Experimental Zoology. 265: 356-366.
- Flik, G., W. Atsma, J.C. Fenwick, F. Rentier-Delrue, J. Smal and S.E. Wendelaar Bonga. 1993. Homologous recombinant growth hormone and calcium metabolism in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, adapted to fresh water. Journal of Experimental Biology 185: 107 – 119.
- Flik, G., P.M. Verbost and S.E. Wendelaar Bonga. 1995. Calcium transport processes in fishes. In: C.M. Wood (ed.). Fish Physiology, vol. 14. Isttulle North, T.J. CED, San Diego, pp.317-341.
- Flik, G. and P.M. Verbost. 1995. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp.251-263.

- Flik, G., P.H.M. Klaren, T.J.M. Schoenmakers, M.J.C. Bijvelds, P.M. Verbost and S.E. Wendelaar Bonga. 1996. Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. Physiological Zoology 69 (2): 403 – 417.
- Fontainhas-Fernandes, A.A., F. Russell-Pinto, E. Gomes, M.A. Reis-Henriques and J. Coimbra. 2001. The effect of dietary sodium chloride on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus*, after transfer from freshwater to seawater. Fish Physiology and Biochemistry 23(4): 307 – 316.
- Fontainhas-Fernandes, A.A., E. Gomes, M.A. Reis-Henriques, J. Coimbra. 2002. Efeito da suplementação da dieta com NaCl no crescimento de tilápia *Oreochromis niloticus* cultivada em diferentes salinidades. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 54(2): 204-211.
- Fordtran, J.S., S.G. Morawski and C.A. Santa Ana. 1985. Effect of magnesium an active and passive sodium transport in the human ileum. Gastroenterology. 89: 1050-1053.
- Gatlin III, D.M., D.S. MacKenzie, S.R. Craig and W.H. Neill. 1992. Effects of dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. The Progressive Fish-Culturist 54: 220-227.
- Grizzie, J.M., K.A. Cummins and C.J. Ashfield. 1993. Effects of environments concentrations of calcium and sodium on the calcium flux in stresses 34-day-old striped bass. Canadian Journal of Zoology 71: 1379-1384.
- Grosell, M. and C.M. Wood. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. Journal of Experimental Biology 205: 1179-1188.
- Horie, M., H. Irisawa and A. Noma. 1987. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. Journal of Physiology 387: 251-272.
- Karbach, U. and H. Feldmeier. 1991. New clinical and experimental aspects of intestinal magnesium transport. Magnesium Research 4: 9-22.
- Kerstetter, T.H. and R.J. White. 1994. Changes in intestinal water absorption in coho salmon during short term seawater adaptation: a developmental study. Aquaculture 121: 171-180.
- Kleinow, K.M. and M.O. James. 2001. Response of teleost gastrointestinal system to xenobiotics. In: D. Schlenck and W.H. Benson (eds). Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts V.1 – Organs. Taylor & Francis, London, pp.269-339.
- Lall, S. P. 1989. The minerals. In: J.E. Halver (ed.). Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 219-257.
- Likongwe, J.S., T.D. Stecko, J.R. Stauffer Jr. and R.F. Carline. 1998. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). Aquaculture 146:37-46.
- Lin, H. and D.J. Randall. 1991. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump in the trout gill epithelium. Journal of Experimental Biology 161: 119-134.
- Kirsch, R., W. Humbert and J.L Rodeau. 1984. Control of the blood osmolarity in fishes with references to the functional anatomy of the gut. In: A. Pequex, R. Gilles and L. Bolis (eds.). Osmoregulation in Estuarine and Marine Animals. Springer Verlag, Berlin, pp. 68-89.

- McDonald, D.G. and C.M. Wood. 1981. Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. Journal of Experimental Biology 93: 101-118.
- Mol, J.H., W. Astma, G. Flik, H. Bouwmeester and J.W.M. Osse. 1999. Effect of low ambient mineral concentrations on the accumulation of calcium, magnesium and phosphorus by early the stages of the air breathing armoured catfish *Megalechis personata* (Siluriformes: Callichthyidae). Journal of Experimental Biology 202: 2121-2129.
- Musselman, N.J., M.S. Peterson and W.J. Diehl. 1995. The influence of salinity and prey content on growth and intestinal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of juvenile bluegill, *Lepomis macrochirus*. Environmental Biology of Fish 42: 303-311.
- O'Connell, J.P. and D.M. Gatlin III. 1994. Effects of dietary calcium and vitamin  $\text{D}_3$  on weight gain and mineral composition of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low-calcium water. Aquaculture 125: 107-117.
- Phillips, A. M. 1944. The physiological effect of sodium chloride upon brook trout. Transactions of American Fisheries Society 74: 297-304.
- Pyle, G.G., C. Kamunde, C.M. Wood and D.G. McDonald. 2003. Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Experimental Biology 206: 609-618.
- Reid, S.D., J.J. Dockray, T.K. Linton, D.G. McDonald and C.M. Wood. 1997. Effect of chronic environmental acidification and summer global warming scenario: protein synthesis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 54: 2014-2024.
- Reid, S.D., D.G. McDonald and C.M. Wood. 1996. Interactive effects of temperature and pollutant stress. In: C.M. Wood and D.G. McDonald (eds.). Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 325-349.
- Robinson, E.H., S.D. Rawles, P.B. Brown, H.E. Yete and L.H. Greene. 1986. Dietary calcium requirements of channel catfish *Ictalurus punctatus* reared in calcium-free water. Aquaculture 53: 263-270.
- Robinson, E.H., D. Labomascus, P.B. Brown and T.L. Linton. 1987. Dietary calcium and phosphorus requirements of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. Aquaculture 64: 267-276.
- Roy, P.K., P.E. Witten, B.K. Hall and S.P. Lall. 2002. Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralization of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). Fish Physiology and Biochemistry 27: 35-48.
- Rude, R.K. 1989. Physiology of magnesium metabolism and the important role of magnesium in potassium deficiency. American Journal of Cardiology 63: 31G-34G.
- Salman, N.A. and F.B. Eddy. 1987. Response of chloride cell numbers and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding. Aquaculture 61: 41-48.
- Salman, N.A. and F.B. Eddy. 1988. Kidney function in response to salt feeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comparative Biochemistry and Physiology 89A (4): 535-539.

- Shearer, K.D. and T. Asgard. 1992. The effect of waterborne magnesium on the dietary magnesium requirement of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry 9(5/6): 387-392.
- Schoenmakers, T.J.M., P.M. Verboost, G. Flik and S.E. Wendelaar Bonga. 1993. Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchange. Journal of Experimental Biology 176: 195-206.
- Shim, K.F., and S.H. NG. 1988. Magnesium requirement of the *Poecilia reticulata* Peters. Aquaculture 73: 131-141.
- Smith, N.F., C. Talbot and F.B. Eddy. 1989. Dietary salt intake its relevance to ionic regulation in freshwater salmonids. Journal of Fish Biology 35: 749 - 753.
- Smith, N.F., F.B. Eddy and C. Talbot. 1995. Effect of dietary salt load on transepithelial Na<sup>+</sup> exchange in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Experimental Biology 198: 2359-2364.
- Stiffler, D.F., J.B. Graham, K.A. Dickson and W. Stockmann. 1986. Cutaneous ion transport in the freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. Physiological Zoology 59: 406-418.
- Talbot, C., T. Preston and B.W. East. 1986. Body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) studied by neutron activation analysis. Comp. Biochem. Physiol. 85 A: 445-450.
- Van Der Velden, J.A., G. Flik, F.A. Spanings, T.G. Verburg, Z.I. Kolar and S.E. Wendelaar Bonga. 1992a. Physiological effects of low-magnesium feeding in the common carp, *Cyprinus carpio*. Journal of Experimental Zoology 264: 237-244.
- Van Der Velden, J.A., G. Flik and S.E. Wendelaar Bonga. 1992b. Prolactin cell activity and ion regulation in tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters): effects of low magnesium diet. Journal Fish Biology 40: 875-885.
- Vilella, S., G.A. Ahearn, G. Cassano, G. and C. Storelli. 1988. Na<sup>+</sup>-dependent L-proline transport by eel intestinal brush-border membrane vesicles. American Physiological Society. pp. 648-653.
- Vilella, S., G. Cassano and C. Storelli. 1989. How many Na<sup>+</sup>-dependent carriers for L-alanine and L-proline in the eel intestine? Studies with brush-border membrane vesicles. Biochimica et Biophysica Acta 984: 188-192.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1993. Endocrinology. In: The Physiology of Fishes. D.H. Evans (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 469-502.
- Wilkie, M.P. and C.M. Wood. 1996. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. Comparative Biochemistry and Physiology 113B: 665-673.
- Zaions, M.I. and Baldisserotto, B. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. Ciência Rural, v.30, n.6, p.1041-1045. 2000.
- Zaugg, W.S., D.D. Roley. E.F. Prentice, K.X. Gores and F.W. Waknitz. 1983. Increase sea water survival and contribution to the fishery of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* by supplemental dietary salt. Aquaculture 32: 183-188.

Zohouri, M.A., G.G. Pyle and C.M. Wood. 2001. Dietary Ca inhibits waterborne Cd uptake in Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology C 130: 347-356.



**CAPITULO 2 SURVIVAL AND GROWTH OF SILVER CATFISH, *Rhamdia quelen*,  
JUVENILES EXPOSED TO DIFFERENT WATERBORNE NH<sub>3</sub> LEVELS AND  
DIETARY AND WATERBORNE Ca<sup>2+</sup>**

Francesca Werner Ferreira<sup>1</sup>, Rafael Behling da Cunha<sup>2</sup> and Bernardo Baldisserotto<sup>2 3</sup>

1 - Departamento de Biologia e Química - Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul; piscis@unijui.edu.br

2 - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria

3 - Corresponding author

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil

Phone: +55-55-3220-9382; fax: 55-55-3220-8241

*e-mail*: bernardo@smail.ufsm.br

## Abstract

The present study examined the effect of experimentally elevating dietary  $\text{Ca}^{2+}$  and water hardness on survival and growth of silver catfish, *Rhamdia quelen*, exposed to different waterborne  $\text{NH}_3$  levels. In the dietary  $\text{Ca}^{2+}$  experiment of determination of  $\text{NH}_3$  lethal concentration in 96 h ( $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ ) juveniles were exposed to five different  $\text{NH}_3$  levels (in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $0.11\pm 0.007$  (control),  $0.36\pm 0.021$ ,  $0.77\pm 0.074$ ,  $1.17\pm 0.071$  and  $1.63\pm 0.315$  and four dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels (in %  $\text{Ca}^{2+}$ ): 0.45, 0.95, 1.45, and 2.45. In the waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  experiment of  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  juveniles were maintained at five different  $\text{NH}_3$  levels ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $0.097\pm 0.017$  (control),  $0.356\pm 0.037$ ,  $0.779\pm 0.141$ ,  $1.459\pm 0.185$  and  $1.770\pm 0.070$  and four water hardness levels (in  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $34.5\pm 4.4$ ,  $62.0\pm 5.7$ ,  $116.0\pm 9.3$ , and  $174.0\pm 22.42$ . In the growth experiment juveniles were exposed to two  $\text{NH}_3$  levels ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.021\pm 0.001$  and  $0.623\pm 0.039$ , and four water hardness levels ( $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $32.1\pm 4.6$ ,  $63.1\pm 5.9$ ,  $119.9\pm 10.0$ , and  $177.3\pm 8.1$  for 40 days. The  $\text{NH}_3$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  was  $0.73$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (0.63 - 0.84) in the dietary  $\text{Ca}^{2+}$  experiment, and  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  was significantly higher in juveniles fed 0.45 and 0.95% dietary  $\text{Ca}^{2+}$ . Water hardness did not change significantly  $\text{NH}_3$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ , which was  $1.20$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (1.10 - 1.24). Weight gain, biomass and specific growth rate at end of the growth experiment were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in juveniles exposed to  $0.021$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_3$  than those exposed to  $0.623$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_3$ . The increase of water hardness impaired all measured parameters in juveniles exposed to the lowest  $\text{NH}_3$  level, but increased them in those exposed to the highest  $\text{NH}_3$  level. This study indicates that low dietary  $\text{Ca}^{2+}$  enhanced survival of silver catfish exposed to high  $\text{NH}_3$  levels, and that the increase of water hardness is recommended only when this species is raised in waters with high growth  $\text{NH}_3$  levels.

**Keywords:** Dietary calcium, Water hardness, Un-ionized ammonia, Fish

## 1 Introduction

In fish farming, good productivity can be only obtained by maintaining good water quality. In poorly maintained fish tanks, poor water quality could impair fish growth rate and/or health. This optimum environment can be achieved artificially by controlling the water quality parameters. When fish are reared at high densities there may be a gradual accumulation of suspended solids and natural metabolites such as ammonia, carbon dioxide and a decrease in dissolved oxygen levels and pH, especially if water flow is restricted (Person-Le Ruyet et al., 1997a). To define environmental water quality standards, it is necessary to determine the safe levels of potentially limiting factors and their interactions. Among water quality criteria, ammonia has been described as one of the most significant limiting factors for growth and survival (Russo and Thurston, 1991; Tomasso, 1994). Most teleost fish are highly sensitive to ammonia toxicity (Haywood, 1983; Handy and Poxton, 1993; Foss et al., 2004) and consequently considerable attention has been paid to ammonia (Emerson et al., 1975; Russo and Thurston, 1991; Wood, 1993; Tomasso, 1994; Person-Le Ruyet et al., 1997ab; El-Shafai et al., 2004).

Ammonia and urea are two major end-products of nitrogen metabolism in fish (Thomas and Piedrahita, 1998) and ammonia exists in both ionized ( $\text{NH}_4^+$ ) and unionized ( $\text{NH}_3$ ) forms, and the last seems to be the most toxic (Russo and Thurston, 1991). Mainly excreted through the gills, ammonia production by fish is primarily dependent of protein intake and metabolic efficiency, which is species specific and might be affected by increasing levels of waterborne ammonia (Dosdat et al., 2003). In intensive high-density systems, ammonia concentration may increase to levels that can reduce growth or even provoke death (Person-Le Ruyet et al., 1997b). Human impact has also contributed to the increment of ammonia introduced into natural waters, as a result of generalized use of fertilizers and other industrial products and from organic waste produced during agriculture activities (Randall and Tsui, 2002). It is therefore clearly important to determine the tolerance limits at which a species experience physiological disturbance and reduced growth from high levels of waterborne  $\text{NH}_3$ .

Acute toxicity of ammonia to fish has been investigated in a number species (Thurston and Russo, 1981; Wajsbrodt et al., 1993; Person-Le Ruyet et al., 1995; Sampaio et al., 2002; Foss et al., 2004) but studies on the effects of chronic  $\text{NH}_3$

exposure in fish are more scarce, partly because of technical difficulty in maintaining steady-state environmental parameters over long period (US EPA, 1999). High  $\text{NH}_3$  levels in water are also known to affect growth (Miranda-Filho et al., 1995; Marcon et al., 2004) promoting histological alteration in several tissues as brain (Wajsbrodt et al., 1993) and muscles (McKenzie et al., 2007), and increasing cardiovascular and respiratory function (McKenzie et al., 2003).

Divalent cations presumably acted on branchial process of ammonia excretion, and  $\text{Ca}^{2+}$  had a more potent effect than  $\text{Mg}^{2+}$  in enhancing ammonia excretion (Iwama et al., 1997). Possible increase in the thickness of the mucus layer at the gill surface may have provide a more stable acidic boundary layer in which conversion of  $\text{NH}_3$  to  $\text{NH}_4^+$  would have been enhanced, and in which a higher blood to water  $\text{NH}_3$  gradient would have been maintained. Moreover, the role of  $\text{Ca}^{2+}$  may lie at the level of the gill in its involvement in tight junction integrity, mucous layer rheology, membrane permeability and proton pump expression (Jobling, 1995; Wilson et al., 1998). It has been shown that elevating waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  levels reduced the associated stress and enhanced ammonia excretion in rainbow trout exposed to highly alkaline (pH 10) water (Yesaki and Iwama, 1992; Wilson et al., 1998). Fish take up calcium for growth and homeostasis predominantly via the gills, directly from the water, by an active and a more or less continuous process and largely independent of waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  (Flik et al., 1996). Fish also take up  $\text{Ca}^{2+}$  from food or water drunk by the intestine (Flik et al., 1993a, b; Flik and Verbost, 1995). The contribution of gills and intestine to  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is variable and depends on waterborne and dietary  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Ferreira and Baldisserotto, 2007). Low waterborne (0.125 mmol) and dietary  $\text{Ca}^{2+}$  reduced growth rate in *Salvelinus fontinalis* (Rodgers, 1984), demonstrating that a minimum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by gills and/or intestine is needed for normal fish growth.

In spite of the protective effect of waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  to high ammonia levels stated by some studies (Yesaki and Iwama, 1992; Iwama et al., 1997; Wilson et al., 1998), studies correlating nutritional demands of  $\text{Ca}^{2+}$  with waterborne ammonia are still missing. If  $\text{Ca}^{2+}$ -supplemented food would provide an efficient protective effect against high ammonia exposure, fish farmers could use this kind of food instead of spending great amounts of lime to increase water hardness (or  $\text{Ca}^{2+}$ ). Consequently, the aim of the present study was to examine the effect of experimentally elevating

dietary  $\text{Ca}^{2+}$  and water hardness on survival and growth of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to different  $\text{NH}_3$  levels.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Experimental animals**

Silver catfish juveniles were bought from fish cultures near Santa Maria, RS, Brazil and transported to the Laboratory of Fish Physiology of the Universidade Federal de Santa Maria. These fish were maintained for 7 days in continuously aerated 250 L tanks ( $25^\circ\text{C}$ , minimum dissolved oxygen levels  $6.00 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and were fed with commercial feed for juveniles with 28% crude protein (2% body mass/day).

### **2.2 Water Quality analysis**

The  $\text{NH}_3$  levels were reached by adding concentrated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ammonium chloride) solution according to Boyd and Tucker (1992). Total ammonia was determined by nesslerization (Greenberg et al., 1976) and  $\text{NH}_3$  was determined according to Piper et al. (1982). Temperature and dissolved oxygen levels were measured with an oxygen meter (model Y5512, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) and pH levels with pH meter DMPH-2 (Digimed, São Paulo, Brazil). Water hardness was analyzed using the EDTA titrimetric method and alkalinity according to Boyd and Tucker (1992).

### **2.3 $\text{LC}_{50-96\text{h}} \text{NH}_3 \times \text{Ca}^{2+}$ diets**

Juveniles ( $4.06 \pm 0.27\text{g}$  and  $7.82 \pm 1.2 \text{ cm}$ ) were randomly redistributed in continuously aerated 2L polypropylene boxes at a stocking density of 9 fish/box. This experiment was conducted at five different  $\text{NH}_3$  levels ( $\text{mg.L}^{-1}$ ):  $0.11 \pm 0.007$  (control group),  $0.36 \pm 0.021$ ,  $0.77 \pm 0.074$ ,  $1.17 \pm 0.071$  and  $1.63 \pm 0.315$  and four dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels (see below). There were three replicates per treatment.

All diets were prepared according to Lazzari (2005), and included meat, bone and soybean meal as main ingredients. These diets have 34% crude protein, 3400

kcal/kg digestive energy and 3% crude fiber. The ingredients were grounded in a blender when necessary, followed by hydration with approximately 50% V/W tap water. To prepare the treatment diets  $\text{CaCO}_3$  was added to the food paste of the control diet (0.45%  $\text{Ca}^{2+}$ ) to yield experimental diets with 0.95; 1.45 and 2.45%  $\text{Ca}^{2+}$ . The resulting paste was mixed and extruded through a paste maker, air-dried and broken into small pellets with a grinder. Actual measured  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the four diets (0.45, 0.95, 1.45, and 2.45%) were (mean $\pm$ SEM)  $3\pm 0.1$ ;  $31\pm 0.6$ ;  $63\pm 1.3$ ;  $127\pm 1.3$  and  $151\pm 1.3$  mmol/kg respectively. Previously (5 days) and throughout experiment fish were fed experimental diets at ration of 2% body mass/day.

Temperature ( $25.8\pm 0.6^\circ\text{C}$ ), dissolved oxygen ( $6.02\pm 0.47$  mg.L<sup>-1</sup>) and pH ( $8.49\pm 0.18$ ) were verified every 12 h. Water hardness ( $10$  mg  $\text{CaCO}_3$ .L<sup>-1</sup>) and alkalinity ( $26\pm 2.75$  mg  $\text{CaCO}_3$ .L<sup>-1</sup>  $\text{CaCO}_3$ ) were measured at the first and last days of experiment.

#### **2.4 LC<sub>50-96h</sub> 5 NH<sub>3</sub> levels X 4 water hardness levels**

Juveniles ( $1.85\pm 0.6$  g and  $6.0\pm 0.54$  cm) were randomly redistributed in continuously aerated 2L polypropylene boxes at a stocking density of 9 fish/box. Experiment were conducted at five different  $\text{NH}_3$  levels (mg.L<sup>-1</sup>):  $0.097\pm 0.017$  (control group),  $0.36\pm 0.037$ ,  $0.78\pm 0.141$ ,  $1.46\pm 0.185$  and  $1.77\pm 0.070$  and four water hardness levels (mg  $\text{CaCO}_3$ .L<sup>-1</sup>):  $34.5\pm 4.4$ ,  $62.0\pm 5.7$ ,  $116.0\pm 9.3$ , and  $174.0\pm 22.42$  (three replicates per treatment). Water hardness was increased by adding  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  to the water.

Temperature ( $24\pm 0.6^\circ\text{C}$ ), dissolved oxygen ( $6.75\pm 0.58$  mg.L<sup>-1</sup>) and pH ( $7.74\pm 0.21$ ) levels were verified every 12 h. Alkalinity ( $26.5\pm 2.0$  mg  $\text{CaCO}_3$ .L<sup>-1</sup>) was measured at the first and last days of experiment. Throughout this experiment juveniles were fed commercial feed with 28% protein crude, at ration of 2% body mass/day. For both experiments every 12 h 90% of the water from the boxes was replaced with previously adjusted  $\text{NH}_3$  levels according to the respective treatments and mortality was recorded. LC<sub>50-96h</sub>  $\text{NH}_3$  was calculated using the methods of probits (Finney, 1971). Observations of feeding behavior (eating or not) and swimming performance (loss of equilibrium, hyper-excitability or lethargy) were also examined. Uneaten food was siphoned 30 min after feeding.

## 2.5 Growth experiment (NH<sub>3</sub> X water hardness)

After the acclimation period, juveniles (2.27±0.14 g and 6.9±0.13 cm) were placed in continuously aerated 40L polypropylene boxes (10 juveniles/box) for 40 days. These fish were exposed to two NH<sub>3</sub> levels (mg.L<sup>-1</sup>), 0.021±0.001 and 0.623±0.039 (approximately 50% LC<sub>50-96h</sub> in the experiment LC<sub>50-96h</sub>\_NH<sub>3</sub> X water hardness – see results) and four water hardness levels (mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>): 32.1±4.6, 63.1±5.9, 119.9±10.0, and 177.3±8.1 (three replicates each). Fish were fed with the commercial food stated in section 2.1.

Temperature (23.2±0.6 °C), dissolved oxygen (7.25±0.05 mg.L<sup>-1</sup>) and pH (7.63± 0.06) were measured twice every day, whereas alkalinity (26.5±1.67 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) and nitrite (maximum level 0.21 mg.L<sup>-1</sup>) three times every week. Removal of uneaten feed and feces and change of 90% of the water from the boxes was performed every day with water with previously adjusted NH<sub>3</sub> and water hardness levels according to the respective treatments.

All remaining juveniles were measured at 0, 10, 20, 30, and 40 days after the beginning of the experiment. Specific growth rate (G) was calculated according to the equation:

$$G = [(\ln W_2 - \ln W_1)/(t)] * 100$$

Where W<sub>1</sub> and W<sub>2</sub> are weight at start and end of growth period, and t is the length of period in days (Jørgensen & Jobling, 1993). Biomass was considered the multiplication of the medium weight at the end of 40 days by number of survivors. The coefficients of variation of length and weight were calculated by the following equation:

$$CV = (SD/X) * 100,$$

where SD is the standard deviation and X is the length or weight mean.

The condition factor (K) was calculated according to equation:

$$K = (W/L^3) * 100,$$

Where W is fish weight and L is body length (Jobling, 1994).

Feeding behavior, swimming performance and mortality were examined throughout the experiment.

## 2.6 Statistical analysis

All results were statistically evaluated using linear regression, two-way ANOVA and Tukey test with the Sigma Plot (version 8.0) and Biostat 4.0 (2005) softwares. The minimum significance level used was 95% ( $P < 0.05$ ).

## 3 Results

### 3.1 LC<sub>50-96h</sub> NH<sub>3</sub> and dietary Ca<sup>2+</sup> levels

Mortality of silver catfish juveniles exposed to  $1.170 \pm 0.071$  and  $1.630 \pm 0.315$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>, on all dietary Ca<sup>2+</sup> levels, increased up to 36 h and were significantly higher (92.3 -100%) than those exposed to  $0.360 \pm 0.02$  and  $0.107 \pm 0.007$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (control) and fed 1.45% dietary Ca<sup>2+</sup> ( $22.2 \pm 1.5$  and  $25.92 \pm 1.3\%$ , respectively). Juveniles exposed to 0.107 and 0.36 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> and fed 1.45% dietary Ca<sup>2+</sup> showed significantly higher mortality (22.2 and 25.9%, respectively) than those fed with the other diets. Juveniles fed lower dietary Ca<sup>2+</sup> supplementation (0.45 – 0.95% Ca<sup>2+</sup>) showed significantly higher LC<sub>50-96h</sub> NH<sub>3</sub> than those fed higher dietary Ca<sup>2+</sup> levels (Table 1).

### 3.2 LC<sub>50-96h</sub> NH<sub>3</sub> and water hardness levels

Mortality of juveniles exposed to  $1.77 \pm 0.068$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>, on all water hardness levels, was significantly higher (86.67-96.67%) than of those exposed to  $1.459 \pm 0.185$  (20-56.67%),  $0.779 \pm 0.141$  (0-3.33%),  $0.356 \pm 0.037$  (3.33-11.11%) and  $0.097 \pm 0.017$  mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (0%). Water hardness did not affect significantly LC<sub>50-96h</sub> (Table 1).

In both experiments, juveniles exposed to the highest NH<sub>3</sub> levels showed impairment of swimming performance, reduced feeding, loss of equilibrium, hyper-excitability, hyperventilation and subsequent death.



Table 1 - LC<sub>50-96h</sub> NH<sub>3</sub> of silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different levels of dietary and waterborne Ca<sup>2+</sup> (water hardness). Different letters in the columns indicate significant difference by one-way ANOVA and Tukey test (P< 0.05)

Dietary Ca <sup>2+</sup> (%)	LC <sub>50-96h</sub>	Water hardness (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	LC <sub>50-96h</sub>
0.45	0.84±0.131 <sup>a</sup>	34.5	1.24±0.386
0.95	0.83±0.153 <sup>a</sup>	62	1.10±0.157
1.45	0.63±0.341 <sup>b</sup>	116	1.23±0.248
2.45	0.63±0.152 <sup>b</sup>	174	1.24±0.264

### 3.3 Interaction NH<sub>3</sub> x water hardness and growth

Juveniles exposed to the highest NH<sub>3</sub> level (0.623±0.039 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>) showed significantly lower weight, weight gain, biomass gain, specific growth rate, and condition factor than juveniles exposed to lowest NH<sub>3</sub> level (0.021±0.0001 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>) on all water hardness at the end of the experiment. Moreover, throughout the experiment juveniles exposed to the highest NH<sub>3</sub> level exhibited a decrease on swimming performance, lethargy, and least frequently, hyper-excitability and loss of equilibrium. Survival in the low NH<sub>3</sub> level was 96.7-100% and the high NH<sub>3</sub> level was 80-96.6% in all water hardness.

Table 2 - Weight gain, biomass, specific growth rate, condition factor and length of silver catfish exposed to different NH<sub>3</sub> and water hardness levels.

NH <sub>3</sub> Levels (mg.L <sup>-1</sup> )	Days	Water hardness (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )					
		32.1	63.1	119.9	177.3		
<b>0.021± 0.0001</b>	Weight gain (g.10days <sup>-1</sup> )	10	2.71±0.15 <sup>a</sup>	2.73±0.08 <sup>a</sup>	2.66±0.04 <sup>a</sup>	2.41±0.17 <sup>b</sup>	
		20	2.62±0.18 <sup>a</sup>	2.84±0.14 <sup>a</sup>	2.70±0.03 <sup>a</sup>	2.42±0.13 <sup>b</sup>	
		30	2.64±0.20 <sup>a</sup>	2.89±0.08 <sup>a</sup>	2.84±0.04 <sup>a</sup>	2.52±0.12 <sup>b</sup>	
	Biomass gain (g.10days <sup>-1</sup> )	10	31.32±1.66	33.95±1.89	33.66±1.07	32.34±2.00	
		20	25.56±2.66 <sup>a</sup>	29.27±1.22 <sup>b</sup>	26.85±0.20 <sup>ab</sup>	25.46±0.33 <sup>a</sup>	
		30	25.98±2.69 <sup>a</sup>	28.28±1.25 <sup>b</sup>	28.28±0.40 <sup>b</sup>	25.62±1.19 <sup>a</sup>	
	Specific growth rate (%.day <sup>-1</sup> )	10	2.58±0.15 <sup>a</sup>	2.58±0.08 <sup>a</sup>	2.28±0.04 <sup>a</sup>	0.84±0.17 <sup>b</sup>	
		20	1.98±0.18 <sup>a</sup>	3.08±0.14 <sup>b</sup>	2.46±0.03 <sup>c</sup>	0.89±0.13 <sup>d</sup>	
		30	2.11±0.19 <sup>a</sup>	3.23±0.07 <sup>b</sup>	3.09±0.04 <sup>b</sup>	1.48±0.12 <sup>c</sup>	
	Condition factor (g.cm <sup>-3</sup> )	10	0.91±0.04	0.81±0.04	0.78±0.02	0.80±0.04	
		20	0.82±0.07	0.79±0.03	0.83±0.05	0.80±0.04	
		30	0.79±0.02	0.77±0.05	0.79±0.07	0,81±0.03	
	Length (cm)	10	6.64±0.10	6.9±0.07	6,77±0.1	6,49±0.18	
		20	6.84±0.22	7.06±0.05	6.87±0.01	6.70±0.34	
		30	6.95±0.28	7.18±0.13	7.07±0.02	6.79±0.32	
	<b>0.623± 0.039</b>	Weight gain (g.10days <sup>-1</sup> )	10	2.53±0.16	2.64±0.11	2.57±0.03	2.53±0.20
			20	2.30±0.08	2.46±0.09	2.45±0.16	2.54±0.17
			30	2.61±0.08 <sup>a</sup>	2.89±0.12 <sup>b</sup>	2.92±0.22 <sup>b</sup>	2.92±0.13 <sup>b</sup>
Biomass gain (g.10days <sup>-1</sup> )		10	30.41±1.60	32.23±0.95	30.91±0.29	30.69±2.01	
		20	22.98±0.90 <sup>a</sup>	20.44±2.34 <sup>b</sup>	23.78±2.02 <sup>a</sup>	25.45±1.44 <sup>a</sup>	
		30	22.52±2.71 <sup>a</sup>	22.30±3.99 <sup>a</sup>	28.16±2.54 <sup>b</sup>	29.46±1.98 <sup>b</sup>	
Specific growth rate (%.day <sup>-1</sup> )		10	1.60±0.16 <sup>a</sup>	2.25±0.11 <sup>b</sup>	1.82±0.03 <sup>a</sup>	1.59±0.0.19 <sup>a</sup>	
		20	0.13±0.09 <sup>a</sup>	1.11±0.09 <sup>b</sup>	1.06±0.16 <sup>b</sup>	1.58±0.17 <sup>c</sup>	
		30	1.80±0.08 <sup>a</sup>	3.37±0.17 <sup>b</sup>	3.61±0.22 <sup>b</sup>	3.53±0.13 <sup>b</sup>	
Condition factor (g.cm <sup>-3</sup> )		10	0,93±0.02	1,03±0.05	0,91±0.04	0,91±0.04	
		20	0,75±0.03	0,77±0.04	0,80±0.06	0,80±0.05	
		30	0,84±0.04	0,87±0.02	0,91±0.03	0,85±0.04	
Length (cm)		10	6.37±0.19	6.25±0.29	6.63±0.18	6.54±0.33	
		20	6.66±0.06	6.88±0.14	6.8±0.20	6.87±0.26	
		30	6.65±0.11	6.91±0.21	6.93±0.25	7.06±0.37	

\*All values are expressed as mean ±SEM (n= 10)

\*\*Initial Weight = 2.28 g

Different letters in the rows indicate significant differences by two way ANOVA and Tukey test (P<0.05)

Weight gain, biomass and specific growth rate at end of the experiment were significantly higher in juveniles exposed to 0.021 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> than those exposed to 0.623 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>. The increase of water hardness impaired all measured parameters

in juveniles exposed to the lowest  $\text{NH}_3$  level, but increased them in those exposed to the highest  $\text{NH}_3$  level (Figure 1).

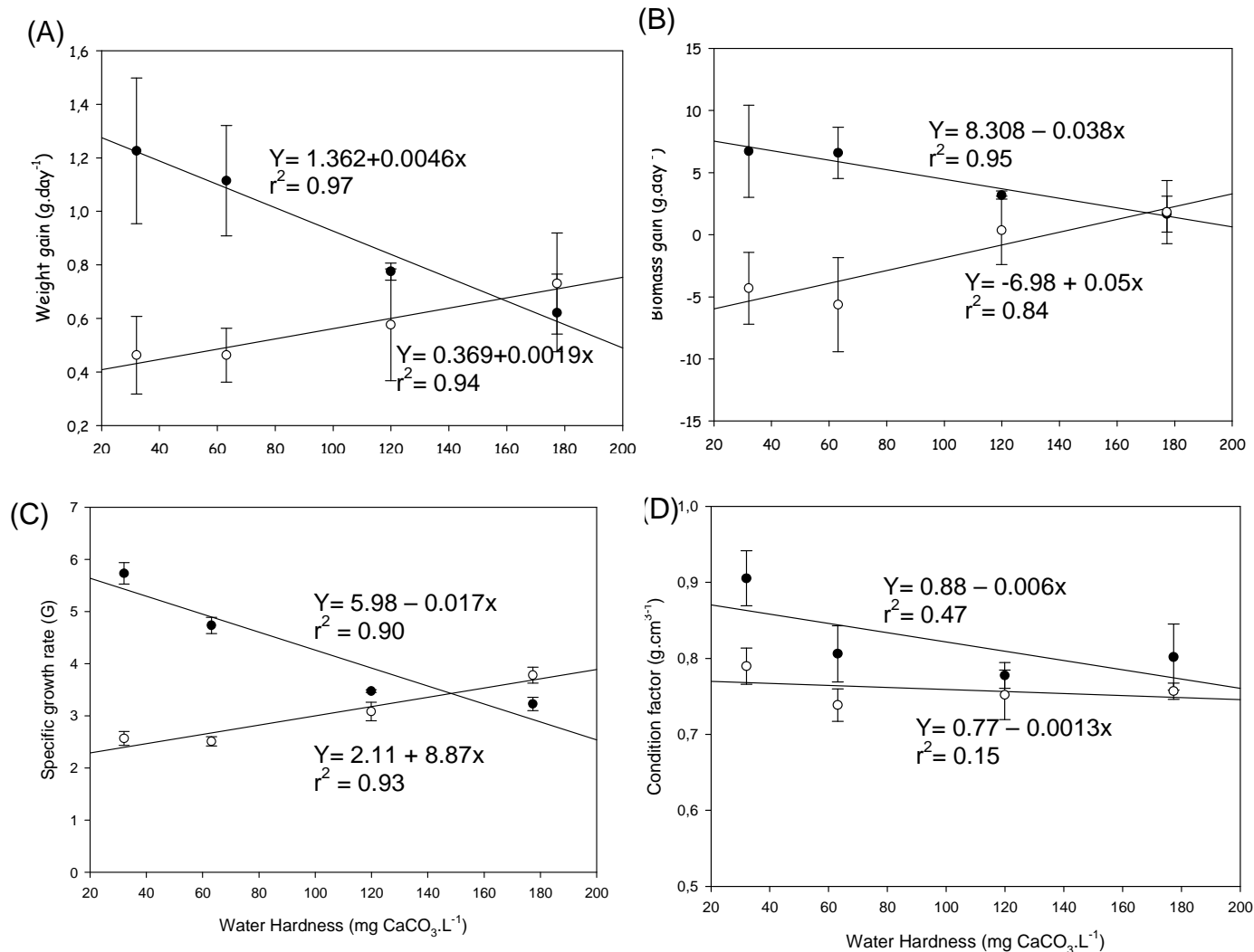


FIGURE 1 – Weight gain (A), biomass gain (B), specific growth rate (C) and condition factor (D) of silver catfish juveniles exposed to different  $\text{NH}_3$  levels and water hardness levels for 40 days (low  $\text{NH}_3$  ● =  $0.021 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; high  $\text{NH}_3$  ○ =  $0.623 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### 4 Discussion

Most fish produce ammonia as an end product of protein metabolism and it is excreted via the gills to the surrounding water. Elevated levels of ammonia in the environment either impair ammonia excretion or result in a net uptake of  $\text{NH}_3$  from the environment. Ammonia effects are immediate and proportional to the concentration, and can be observed after 15 minutes of exposure by swimming difficulties, increased oxygen consumption (Lamarié et al., 2004), and ionic imbalance (Eddy, 2005). Chronic  $\text{NH}_3$  exposure may affect fish in several ways, e.g. gill hyperplasia

(Thurston and Russo, 1978; Schwaiger et al., 1997; Wood, 2001), changes in mucous production, growth and stamina (Lang et al., 1987), increase in gill ventilation, muscle depolarization (Taylor, 2000) and may also act directly on the central nervous system, causing loss of equilibrium, hyperventilation, hyperexcitability and changes in behavior, coma, convulsions and death (Russo and Thurston, 1991; McKenzie et al., 1993; Wajsbrodt et al., 1993; Eddy, 1999; Ip et al., 2001; Foss et al., 2004). A likely cause of ammonia toxicity may be the depolarizing effect of  $\text{NH}_4^+$  on neurons leading to excessive activation of NMDA receptors (n-methyl d-aspartate receptors) and subsequent death of cell (Ip et al., 2001; McKenzie et al., 2003). A study on rainbow trout showed that brain ATP and NADP levels were disrupted when fish were exposed to ammonia concentrations near the  $\text{LC}_{50}$  value but were not affected under conditions of sublethal exposure. However, exposure to sublethal concentrations of ammonia disrupted cerebral amino acid metabolism (Walsh et al., 2007). For tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposed to  $0.54 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$ , signs of hyperactivity have been observed after 42 hours. At concentration of  $0.93$ ,  $1.40$  and  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$ , an inverse correlation was observed between  $\text{NH}_3$  levels and survival time, and 30% of the tambaqui were hyperactive and convulsion started before 24 hours of exposure at  $0.93 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$ . The first death occurred 48 h after the experiment started and at 72 h all fish were death. This fish exposed to  $1.40$  and  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$  were all dead 48 and 39 h after the beginning of experiment, respectively. In acara-au (*Astronotus ocellatus*), the first reaction to  $\text{NH}_3$  intoxication was observed after 15 h of exposure to  $1.78$  and  $1.86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$ , resulting in 10 and 20% mortality, respectively, at the end experiment (Marcon et al., 2004).

In general, reported  $\text{LC}_{50-96\text{h}} \text{ NH}_3$  range from  $0.32-0.84 \text{ mg.L}^{-1}$  for salmonids and from  $0.40-3.1 \text{ mg.L}^{-1}$  for non-salmonids (Ruffier et al., 1981). However, fish exposed to sublethal concentration of  $\text{NH}_3$  suffer histological and physiological changes in different organs with on overall result of decrease weight relative to unexposed fish (Thurston et al., 1986; Wajsbrodt et al., 1993; McKenzie et al., 2007).

Exposure of rainbow trout to alkaline conditions ( $\text{pH} >9$ ) has been shown to inhibit ammonia excretion, leading to problems of ammonia accumulation, toxicity and death. There is some evidence that higher environmental  $\text{Ca}^{2+}$  levels may ameliorate the negative effects of alkaline exposure. Wilson et al (1998) investigated the effects of environmental  $\text{Ca}^{2+}$  on the recovery of rate ammonia excretion during acute exposure ( $< 6 \text{ h}$ ) of rainbow trout to high pH and concluded that this species

survive alkaline exposure by reducing ammonia production and that the role of  $\text{Ca}^{2+}$  may be in ameliorating the stress of alkaline exposure. In our experiment the best survival of silver catfish juveniles was observed at that exposed to waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  and pH 7.74 (mean  $\text{LC}_{50}$  1.20) than those submitted to four dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels and pH 8.49 (mean  $\text{LC}_{50}$  0.78). Similar values were previously found for this species at pH 7.5 and 8.2 (1.45 and 2.09  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectively) (Miron et al., *in press*). Marcon et al. (2004) verified that the  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  for  $\text{NH}_3$  in tambaqui and acara-au was 0.69 (0.64-0.73) and 2.01 (1.92-2.10)  $\text{mg.L}^{-1}\text{NH}_3$ , respectively. No signs of abnormal behavior were observed for tambaqui exposed to 0.35, 0.41 and 0.47  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3$ . Similar results were obtained for acara-au juveniles exposed 0.47, 0.93 and 1.40  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3$ . Larvae of *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes argentinensis* presented  $\text{NH}_3$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  of 0.71 and 0.73-0.96  $\text{mg.L}^{-1}\text{NH}_3$ , respectively (Piedras et al., 2006; Sampaio and Minillo, 2000).

Water hardness did not change significantly  $\text{NH}_3$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  of silver catfish but juveniles fed low dietary  $\text{Ca}^{2+}$  (0.45 and 0.95%) showed significantly higher  $\text{NH}_3$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  (0.83 and 0.84, respectively) than those fed higher dietary  $\text{Ca}^{2+}$  (1.45 and 2.45%). Intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption in freshwater fishes is related to dietary  $\text{Ca}^{2+}$  and absorption rate is affected by branchial uptake, which is related to waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Flik et al., 1995).

For channel catfish (*I. punctatus*) the  $\text{LC}_{50-24\text{h}}$  was 4.5  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3$  when maintained at pH 9.0 and water hardness 40  $\text{mg.L}^{-1}\text{CaCO}_3$ . Nevertheless, in juveniles from this species maintained at pH 7.0 the  $\text{LC}_{50-24\text{h}}$  was 2.64  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{NH}_3$  (Tomasso et al., 1980). This demonstrated that  $\text{NH}_3$  tolerance in this species may change according to water pH.

The knowledge of  $\text{NH}_3$  levels that limit growth and impair respiration is useful for aquaculture management and may assist in the maximization of production. For silver perch, *Bydianus bydianus*, 0.36  $\text{mg.L}^{-1}\text{NH}_3$  decreased weight gain and specific growth rate, but not food conversion rate compared to control fish. This may indicate that some of the energy derived from the relatively high feed consumption of fish exposed to this  $\text{NH}_3$  level may have been expended on metabolic maintenance rather than growth (Frances et al., 2004). Silver catfish juveniles maintained at pH 8.2 showed reduced growth and survival when  $\text{NH}_3$  levels are higher than 5%  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  (Miron, 2004). In our study it was verified that silver catfish submitted at high  $\text{NH}_3$  level also decrease growth, but those submitted to high water hardness showed

better weight gain, biomass gain and specific growth rate than those submitted to low water hardness.

How  $\text{Ca}^{2+}$  environmental ameliorates the stress associated with high  $\text{NH}_3$  is not known. However, It known that  $\text{Ca}^{2+}$  plays a role in the maintenance of ion homeostasis (Tomasso, 1980; Yesaki and Iwama, 1992). Rainbow trout exposed to alkaline hard water were able to maintain plasma  $\text{Na}^+$  levels, while in those exposed to alkaline soft water, plasma  $\text{Na}^+$  declined until death (Yesaki and Iwama, 1992). Sodium influx is inhibited during alkaline exposure (Wilkie et al., 1996). The role of  $\text{Ca}^{2+}$  may lie at the level of the gill in its involvement in tight junction integrity, mucous layer rheology, membrane permeability and proton pump expression (Wright and Wood, 1985; Lin and Randall, 1991; Yesaki and Iwama, 1992; Wilson et al., 1994)

The present study indicate that the use of low dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels and/or high water hardness levels may be an interesting strategy to ameliorate survival and growth of silver catfish juveniles exposed to high  $\text{NH}_3$  levels.

## Acknowledgements

This study was supported by grant MCT/SEAP/FINEP - AQUICULTURA – Ação Transversal 12/2005. B. Baldisserotto and R. B. Cunha are the recipients of a CNPq research fellowship and a FAPERGS undergraduate fellowship, respectively.

## References

- Alabaster, J.S., Shurben, D.G., Malleit, M.J. 1983. The acute toxicity of mixture of cyanide and ammonia to smolts of salmon, *Salmo salar* L. at low concentration of dissolved oxygen. Journal of Fish Biology. 22, 215-222.
- Baldisserotto, B., C. Kamunde, A. Matsuo and Wood, C.M. 2004a. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. Aquatic Toxicology. 67: 57-73.
- Baldisserotto, B., C. Kamunde, A. Matsuo, and Wood, C.M. 2004b. Acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout is reduced by dietary calcium carbonate. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C 137: 363-372.
- Beaumont, M.W.; Butler, P.J. and Taylor, E.W. 1995. Plasma ammonia concentration in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to acidic water and sublethal copper concentration and its relationship to decreased swimming performance. Journal Experimental Biology. 198, 2213-2220.
- Boyd, C. and Tucker, C.S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture. Auburn University, Auburn, Al, USA. 183pp.

- Dosdat, A.; Person-Le Ruyet, J.; Covès, D.; Dutto, G.; Gasset, E.; Le Roux, A. & Lemarié, G. 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilization and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquatic Living Resources 16: 509-520.
- Eddy, F.B. 1999. Ammonia in estuaries and effects on fish. Review paper. Journal of Fish Biology. 67, 1495-1513.
- Eddy, F.B. 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish. Review Paper. Journal of Fish Biology, v.67: 1495-1513.
- El-Shafai, S.A.; El-Gohary, F.A.; Nasr, F.A.; Steen, N.P. van der; Gijzen, H.J. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 232: 117-127.
- Emerson, K.R., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effects of pH and temperature. Journal Fisheries Research Board Canadian 32, 2377-2383.
- Ferreira, F.W. and Baldisserotto, B. 2007. Dieta and Osmoregulation. In: Baldisserotto, B.; Mancera, J.M.; Kapoor, B.G. Fish Osmoregulation. Eds. Enfield, USA: Science Publisher. 2007.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press. 333p.
- Flik, G.; Van Der Velden, J.A.; Dechering, K.J.; Verbost, J.M.; Schoenmakers, J.M.T.H.; Kolar, Z.I.; Wendelaar Bonga, S.E. 1993a. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: A review. Journal of Experimental Zoology, 265: 356–366.
- Flik, G., Atsma, W.; Fenwick, J.C.; Rentier-Delrue, F.; Smal, J.; Wendelaar Bonga, S.E.. 1993b. Homologous recombinant growth hormone and calcium metabolism in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, adapted to fresh water. Journal of Experimental Biology, 185: 107–119.
- Flik, G.; Verbost, P.M. 1995. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, pp. 251–263.
- Flik, G., Verbost, P.M.; Wendelaar Bonga, S.E.. 1995. Calcium transport processes in fishes. In: Fish Physiology, C.M. Wood (ed.). Institute North, T.J. CED, San Diego, Vol. 14, pp. 317–341.
- Flik, G.; Klaren, P.H.M.; Schoenmakers, T.J.M.; Bijvelds, M.J.C.; Verbost, P.M.; Wendelaar Bonga, S.E. 1996. Cellular calcium transport in fish: Unique and universal mechanisms. Physiological Zoology, 69: 403–417.
- Foss, A.; Siikavuopio, S.I.; Sæther, B.S.; Evensen, T.H. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. Aquaculture, 237: 179-189.
- Frances, J.; Nowak, B.F. and Allan, G.L. 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture 183, 95-103.
- Greenberg, A.E.; Taras, M.J. and Rand, M.C. 1976. Standart Methods for examination of water and wastewater. 14<sup>th</sup> edn. Bru-El Graphic Inc., Springfield, 1193p.

- Handy, R.D., Poxton, M.G. 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 3: 205-280.
- Haywood, G.P. 1983. Ammonia toxicity in teleost fishes: a review. Canadian Technology Reproduction Fisheries Aquatic Sciences, 1177:1-35.
- IP, Y.K.; Chew, S.F.; Randall, D.J. 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. In: Wright, P.A. and Anderson, P.M. (Eds.). Fish Physiology, vol. 20. Academic Press, New York, pp. 109-148.
- Iwama, G.K.; McGeer, J.C. Wright, P.A.; Wilkies, M.P. and Wood, C.M. 1997. Divalent cations enhance ammonia excretion in Lahontan Cutthroat trout in highly alkaline water. Journal of Fish Biology, 50: 1061-1073.
- Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. Chapman & Hall, London.
- Jobling, M. 1995. Environmental Biology of Fishes. Chapman & Hall, London.
- Jørgensen, E.H. & Jobling, M. 1993. The effects of exercise on growth, food utilization and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 116: 233-46.
- Lemarié, G.; Dostat, A.; Covès, D.; Dutto, G.; Gasset, E.; Person-Le-Ruyet, J. 2004. Effect chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture, 192: 233-247
- Lang, T.; Peters, G.; Hoffman, R.; Meyer, E. 1987. Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structures of rainbow trout *Salmo gairdneri*. Disease Aquatic Organisms, 3: 159-165.
- Lazzari, Rafael. Estudo de enzimas, crescimento e composição centesimal de filés de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com diferentes fontes protéicas. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade federal de Santa Maria, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, RS, 2005.
- Lin, H.; Randall, D.J. 1991. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. Journal Experimental Biology, 161: 119-134.
- Marcon, J.L.; Moreira, S.S.; Fim, J.D.I. 2004. Median lethal concentration (CL50) for un-ionized ammonia in two Amazonian fish species, *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. In: Fish Culture Performance in the Tropics (ed. By ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; M<sup>ac</sup>KINLAY, D.) pp. 105-115. Proceedings of the Symposium on International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brazil, 2004.
- McDonald, D.G. & Wood, C.M. 1981. Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. Journal of Experimental Biology, 93: 101-118.
- McDonald, M.D. & Wood, C.M. 1998. Reabsorption of Urea by Kidney of Freshwater Rainbow Trout. Fish Physiology and Biochemistry 18: 375-386.
- McKenzie, D.J.; Randall, D.J.; Lin, H. and Aota, S. 1993. Effects of changes in plasma pH, CO<sub>2</sub> and ammonia on ventilation in trout. Fish Physiology and Biochemistry, 10: 507-515.
- McKenzie, D.J.; Shingles, A.; Domenici, P.; Taylor, E.W. 2007. Effects of ammonia on locomotor performance in fishes. In: Fish Physiology, Toxicology and Water Quality (ed. By BRAUNER, C.J.; SUVAJDZIC, K.; NILSSON, G. RANDALL, D.) pp. 49-63. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, 2006.
- Miranda-Filho, K.C.; Wasielesky-Jr, W.; Maçaba, A.P. 1995. Efeito da ammonia e nitrito no crescimento de *Mugil platanus* (Piscis, Mugilidae). Revista Brasileira



- de *Biologia*, 55: 45-50. Miron, D.S. Efeito da amônia em diferentes níveis de pH da água na sobrevivência e no crescimento de alevinos de jundia *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). 2004. 41f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2004
- Miron, D.S.; Moraes, B.; Becker, A.; Crestani, M.; Spanevello, R.; Loro, V.L.; Baldisserotto, B.; 2008. Interactions between water ammonia and pH on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*, (In press)
- Moraes, G.; Altran, A.E. & Avilez, I.M. 2002. Ornithine-Urea Cycle in the Brazilian Catfish *Pseudoplatystoma coruscans* During Early-Life Stages. In Nitrogen Excretion in Fish, Symposium Proceedings, Physiology Section, American Fisheries Society.
- Naddy, R.B.; Stubblefield, W.A.; May, J.R.; Tucker, S.A. & Hockett, J.R. 2002. The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 21, nº2, pp. 347-352.
- Person-Le Ruyet, J; Chartois, H; Quemener, L. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* 136: 181-194.
- Person-Le Ruyet, J.; Delbard, C.; Chartois, H.; Le Delliou, H. 1997a. Toxicity of ammonia to turbot juveniles: 1. Effects on survival, growth and food utilization. *Aquatic Living Resource*. 10: 307-314.
- Person-Le Ruyet, J.; Galland, R.; Le Roux, A.; Chartois, H. 1997b. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 154, 155-171.
- Piedras, D.R.N; Pouey, J.L.O.F.; Moraes, P.R.R. and Cardoso, D.F. 2006. Lethal concentration (CL<sub>50</sub>) of un-ionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. *Science Agricola* V.63, n.2, p.184-186, Mar/Apr. Note
- Piper, R.G.; McElwain, I.B.; Orme, L.E.; McCraren, J.P.; Fowler, L.G. & Leonard, J.R. 1982. *Fish Hatchery Management*. Washington: United States Department of Interior Fish and Wildlife Service, 517p.
- Pratap, H.B. & Wendelaar Bonga, S.E. 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills of freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicology*, 26: 133-150.
- Randall, D.J. and Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 165-179.
- Rodgers, D.W. 1984. Ambient pH and Calcium Concentrations as Modifiers of Growth and Calcium Dynamics of Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, 41: 1774-1780.
- Russo, R.C. Thurston, R.V. 1991. Toxicity of ammonia nitrite and nitrate to fishes. Aquaculture and water quality. In: Brune, E., Tomasso, J.R. (eds), *Advances in World Aquaculture*, vol. 3. WAS, pp. 58-89.
- Ruffier, P.J. ; Boyle, W.C.; Kleinschmidt, J. 1981. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and affluent standards. *Journal Water Pollution Control Federation*, 53: 367-377
- Sampaio, I.A.; Minillo, A. 2000 Viabilidade do uso de larvas de *Odonthestes argentinensis* em testes de toxicidade: Efeito da salinidade e da temperatura sobre a toxicidade aguda da amônia. In: Espindola, E.L.G.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A.I. (ed). *Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI*. São Carlos: RIMA, p.545-553.

- Schlenk, D. & Benson, W.H. 2001. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. Volume 1 – Organs. Taylor & Francis, London.
- Suther, B.J. 1990. Population level indicators of stress. American Fisheries Society Symposium. 8: 145-166
- Schoenmakers, T.J.M.; Verbost, P.M.; Flik, G.; Wendelaar Bonga, S.E. 1993. Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchanges. Journal of Experimental Biology, 176: 195-206.
- Taylor, E. 2000. Effects of exposure to sublethal levels of copper on brown trout: mechanisms of ammonia toxicity. In: Randall, D.J.; Xiang, H.; Thurston, R.V. (Eds). Proceedings of the Fifth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality. City University of Hong Kong. US Environmental Protection Agency, Athens, GA, USA, pp 51-68
- Thomas, S.L. and Piedrahitas, R.H. 1998. Apparent ammonia-nitrogen production rates of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in commercial aquaculture systems. Aquaculture Engineering, 17: 45-55.
- Thurston, R.V.; Russo, R.C. 1978. Ammonia and Nitrite Toxicity to Fishes. In Proceedings of the second USA-USSR Symposium on the Effects of Pollutants upon Aquatic Ecosystems. EPA, USA.
- Thurston, R.V.; Russo, R.C. 1981. Ammonia Toxicity to Fishes. Effect of pH on the Toxicity of the Un-ionized Ammonia Species. Environmental Science & Technology, vol 15, p. 837-840.
- Thurston, R.V.; Russo, R.C.; Meyn, E.L.; Zajdel, R.K.; Smith, C.E. 1986. Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows. Transactions of the American Fisheries Society, n.15, p. 196-207.
- Tomasso, J.R.; Chervi, A.; Goudie, Bill, A. Simco & Davis, K.B. 1980. Effects of Environmental pH and Calcium on Ammonia Toxicity in Channel Catfish. Transactions of the American Fisheries Society, v. 109, p. 229 – 234.
- Tomasso, J.R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Reviews in Fisheries Science, v. 2, n.4, p. 291-314.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1999. Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. EPA-822-R-99-014. Washington, D.C.
- Varanasi, U. & Gmur, D. 1978. Influence of water-borne and dietary calcium uptake and retention of lead by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Toxicology and Applied Pharmacology, 46: 65-75.
- Veauvy, C.M., Wang, Y., Walsh, P.J., Pérez-Pinzón, M.A., 2002. Comparison of the effects of ammonia on brain mitochondrial function in rat and toadfish (*Opsanus beta*). American Journal Physiology. 283, R598–R603.
- Veauvy, C.M., McDonald, M.D., Van Audekerke, J., Vanhoutte, G., Van Camp, N., Van der Linden, A., Walsh, P.J., 2005. Ammonia affects brain nitrogen metabolism but not hydration status in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). Aquat. Toxicol. 74, 32–46.
- Wajsbrodt, N.; Gasith, A.; Diamant, A. & Popper, D.M. 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. Journal of Fish Biology 42: 321-328.
- Walsh, P.J.; Veauvy, C.M.; McDonald, M.D.; Pamenter, M.E.; Buck, L.T.; Wilkie, M.P. 2007. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 147, p.332-343.

- Welsh, P.G.; Lipton, J.; Champman, G.A. & Podrabsky, T.L. 2000. Relative importance of calcium and magnesium in hardness-base modification of copper toxicity. Environmental toxicology and chemistry, vol. 19, nº 6, pp. 1624-1631.
- Wilkie, M.P. 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comparative Biochemistry and Physiology, A118: 39-50.
- Wilson, R.W.; Waight, P.A.; Munger, S. & Wood, C.M. 1994. Ammonia excretion in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the importance of gill boundary layer acidification : lack of evidence for  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  exchange. Journal of Experimental Biology, 191: 37-58.
- Wilson, J.M.; Iwata, K.; Iwama, G.K. and Randall, D.J. 1998. Inhibition of ammonia excretion and production in rainbow trout during severe alkaline exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 121, 99-109.
- Wood, C.M. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans, D.H. (ed.). The Physiology of Fishes, CRC Press, London, pp. 379-425.
- Wood, C.M. 2001. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.W.; Benson, W.H. (Eds). Traget Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, vol. 1, Organs, Taylor and Francis, Washington, DC. Pp. 1-89.
- Wright, P.A.; Fleskie, A. and Anderson, P.M. 1995. Induction of ornithine-urea cycle enzymes and nitrogen metabolism and excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during early life stages. Journal of Experimental Biology, 198. 127-135.
- Wright, P.A.; Wood, C.M.1985. An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: effects of environmental pH change and sodium uptake blockade . Journal Experimental Biology, 114: 329-351.
- Yesaki, T.Y. and Iwama, G.K. 1992. Survival, acid-base regulation, ion regulation, and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water. Physiological Zoology, 65, 763-787.
- Zaions, M.I. & Baldisserotto, B. 2000.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  body levels and survival at fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes water pH. Ciência Rural, v.30, n.6, p. 1041-1045.

**CAPÍTULO 3 SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIA,  
*Rhamdia quelen*, EXPOSTOS A DIFERENTES NÍVEIS DE O<sub>2</sub> E DE Ca<sup>2+</sup> NA  
DIETA E NA ÁGUA**

Francesca Werner Ferreira<sup>1</sup>, Rafael Behling da Cunha<sup>2</sup> and Bernardo Baldisserotto<sup>2,3</sup>

1 - Departamento de Biologia e Química - Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul; piscis@unijui.edu.br

2 - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria

3 - Autor para correspondência:  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil  
telefone: 55-3220-9382; fax: 55-3220-8241  
e-mail: bernardo@smail.ufsm.br

## ABSTRACT

The present study examined the effect of experimentally elevating dietary  $\text{Ca}^{2+}$  and water hardness on survival and growth of silver catfish, *Rhamdia quelen*, exposed to different waterborne  $\text{O}_2$  levels. In the dietary  $\text{Ca}^{2+}$  experiment of determination of  $\text{O}_2$  lethal concentration in 96 h ( $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ ) juveniles ( $4.75 \pm 0.65$  g e  $7.56 \pm 0.61$  cm) were exposed to five different  $\text{O}_2$  levels (in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): ( $0.41 \pm 0.13$ ,  $0.71 \pm 0.15$ ,  $0.97 \pm 0.13$ ,  $1.44 \pm 0.35$  and  $6.41 \pm 0.60$   $\text{mg/L}$ ) and four dietary  $\text{Ca}^{2+}$  levels (in %  $\text{Ca}^{2+}$ ): 0.45, 0.95, 1.45 and 2.45. In the waterborne  $\text{Ca}^{2+}$  experiment of  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  juveniles ( $3.66 \pm 0.75$  g e  $7.32 \pm 0.5$  cm) were maintained at five different  $\text{O}_2$  levels ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): ( $0.27 \pm 0.10$ ,  $0.74 \pm 0.26$ ,  $1.33 \pm 0.14$ ,  $1.74 \pm 0.32$  and  $6.55 \pm 0.02$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and four water hardness levels (in  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ): (28, 116, 116 e 180). In the growth experiment juveniles were exposed to two  $\text{O}_2$  levels ( $1.47 \pm 0.04$  and  $6.46 \pm 0.06$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and four water hardness levels ( $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $30 \pm 2.0$ ,  $61 \pm 2.5$ ,  $121 \pm 3.0$  e  $180 \pm 3.0$  for 15 days. The  $\text{O}_2$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  was 0.89  $\text{mg/L}$  (CI 0.64 – 1.34  $\text{mg/L}$ ) in the dietary  $\text{Ca}^{2+}$  experiment, and  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  was significantly higher in juveniles fed 2.45 and 0.45% dietary  $\text{Ca}^{2+}$ . Higher water hardness increased survival in hypoxic levels, and  $\text{O}_2$   $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  at 180  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  was not determined due to low mortality in the tested levels. Weight gain, biomass, length and specific growth rate at end of the growth experiment were significantly higher in juveniles exposed to  $6.46 \pm 0.06$  than those exposed to  $1.47 \pm 0.04$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{O}_2$ . The increase of water hardness increased all measured parameters in juveniles exposed to the lowest  $\text{O}_2$  level, but they were impaired in those exposed to the highest  $\text{O}_2$  level. This study indicates that low dietary  $\text{Ca}^{2+}$  enhanced survival of silver catfish exposed to low  $\text{O}_2$  levels, and that the increase of water hardness is recommended only when this species is raised in waters with low growth  $\text{O}_2$  levels.

**Keywords:** Dietary calcium, Water hardness, Oxygen, Fish

## RESUMO

Este trabalho verificou o efeito de dietas com  $\text{Ca}^{2+}$  e da dureza da água na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen*, expostos a diferentes níveis de  $\text{O}_2$  na água. No primeiro experimento para determinar a concentração letal em 96 horas ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ) os juvenis ( $4,75 \pm 0,65$  g e  $7,56 \pm 0,61$  cm) foram expostos a 5 concentrações de  $\text{O}_2$  na água (em mg/L): ( $0,41 \pm 0,13$ ;  $0,71 \pm 0,15$ ;  $0,97 \pm 0,13$ ;  $1,44 \pm 0,35$  and  $6,41 \pm 0,60$  mg/L) e 4 níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta (em %  $\text{Ca}^{2+}$ ): 0,45; 0,95; 1,45 and 2,45. No experimento para verificar a  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  em diferentes níveis de dureza, os juvenis ( $3,66 \pm 0,75$  g e  $7,32 \pm 0,5$  cm) foram mantidos em 5 diferentes concentrações de  $\text{O}_2$  (mg/L):  $0,27 \pm 0,10$ ;  $0,74 \pm 0,26$ ;  $1,33 \pm 0,14$ ;  $1,74 \pm 0,32$  e  $6,55 \pm 0,02$  mg/L e 4 níveis de dureza (em mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ): 28, 116, 116 e 180. No experimento para verificar o crescimento, os juvenis foram expostos a duas concentrações de  $\text{O}_2$  ( $1,47 \pm 0,04$  e  $6,46 \pm 0,06$  mg/L) e 4 níveis de dureza na água (mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ):  $30 \pm 2,0$ ;  $61 \pm 2,5$ ;  $121 \pm 3,0$  e  $180 \pm 3,0$  por 15 dias. A  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  no experimento com  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta foi de 0,89 mg/L (IC 0,64 – 1,34 mg/L) e foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) nos juvenis alimentados com 2,45 and 0,45% de  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta. Altos níveis de dureza aumentaram a sobrevivência dos juvenis submetidos a baixas concentrações de  $\text{O}_2$ . A  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  na dureza de 180 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  não foi determinada devido a baixa mortalidade nos níveis testados. No experimento de crescimento, os juvenis expostos à maior concentração de  $\text{O}_2$  ( $6,46 \pm 0,06$  mg/L), o ganho de peso, biomassa, comprimento e taxa de crescimento específico foram significativamente maiores nos níveis mais baixos de dureza ( $30 \pm 2,0$  e  $61 \pm 2,5$   $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ) do que os submetidos à maiores níveis de dureza ( $121 \pm 3,0$  e  $180 \pm 3,0$   $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ). Nos juvenis expostos à menor concentração de  $\text{O}_2$  ( $1,47 \pm 0,04$  mg/L), o aumento da dureza da água melhorou todos os parâmetros medidos. Este estudo indica que dietas com baixos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam a sobrevivência de juvenis de jundiá expostos a baixas concentrações de  $\text{O}_2$  na água e que o aumento da dureza deve ser recomendado somente em situações de hipóxia

**Palavras-chave:** Cálcio na dieta Dureza, Oxigenio, Peixe

## 1 INTRODUÇÃO

Para alcançar uma boa produtividade, uma das variáveis físico-químicas mais importantes para aquicultura é o nível de oxigênio dissolvido, o qual deve ser mantido numa concentração adequada. Episódios de hipóxia podem ser devastadores para muitos ecossistemas porque podem causar mortalidade em massa, diminuição da fauna bêntica, declínio na produção íctica, mudanças na composição da comunidade e conseqüentemente diminuição da diversidade animal.

Em cultivos intensivos, situações de hipóxia são comuns, podendo ocorrer por diferentes causas e produzindo vários efeitos. A diminuição no nível de  $O_2$  na água pode ser resultante do desequilíbrio entre as taxas de fotossíntese e de respiração, da decomposição da matéria orgânica, de altas densidades populacionais, aumento da temperatura dentre outros fatores.

Baixas concentrações de  $O_2$  ambiental afetam o crescimento, o consumo de alimento e o estado fisiológico dos peixes (Jobling, 1994). Para a maioria dos peixes os níveis de  $O_2$  requeridos são ao redor de 5-6 mg/L (Boyd & Tucker, 1992; Baldissertotto, 2002). Para muitos peixes, níveis inferiores a 3 mg/L, podem ser muito estressantes e abaixo de 1 mg/L, podem ser letais. Os níveis de  $O_2$  que provocam diminuição do crescimento variam conforme as espécies. Nos salmões, *Oncorhynchus kisutch* e *O. nerka*, em *Micropterus salmoides* e na carpa, *Cyprinus carpio* o crescimento é afetado em concentrações abaixo de 4-5mg/L (Brett & Blackburn, 1981). Para a truta arco-iris, *O. mykiss*, a concentração mínima de  $O_2$  para o crescimento está muito acima de 7 mg/L (Pedersen, 1987). Pichavant et al. (2000, 2001) demonstraram que para juvenis de *Scophthalmus maximus* há uma redução do crescimento quando submetidos a 5,0 mg $O_2$ /L.

Na adaptação das diferentes espécies a condições de hipóxia os teleósteos apresentam diversas estratégias comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas como a mudança de ambiente, respiração superficial, aumento da ventilação, diminuição da taxa metabólica, alterações morfológicas dentre outras que otimizam a utilização do  $O_2$  (Val, 1996; Hochachaka, 1996; Muusze et al., 1998; Crapton, 1998; Fernandes et al., 1999; Burlison, 2001).

Geralmente, os peixes respondem à diminuição dos níveis de oxigênio através do aumento da freqüência e do volume ventilatório (Randall, 1982). O custo

da ventilação pode ser estimado de 3-30% do consumo de O<sub>2</sub> em normóxia (Rantin et al., 1992). Porém, em situações de hipóxia, este custo pode chegar a 50%, diminuindo, dessa forma, a energia disponível para outros processos metabólicos (Valverde et al., 2006). Se as concentrações de O<sub>2</sub> continuam diminuindo os animais são incapazes de obter o O<sub>2</sub> necessário e suas funções vitais são afetadas. Muitas espécies de peixes, chamadas “reguladoras”, mantêm uma taxa de consumo de O<sub>2</sub> (ou metabolismo padrão) constante, independente da concentração de O<sub>2</sub> na água. Abaixo desse nível crítico, a taxa metabólica diminui e o animal utiliza metabolismo anaeróbico, com conseqüente acumulação de lactato (Steffensen, 1985). Por outro lado, nos “conformadores” o consumo de O<sub>2</sub> está diretamente relacionado à concentração deste na água, pois eles não têm habilidade para manter a taxa metabólica padrão durante a hipóxia. O nível ótimo de O<sub>2</sub> pode ser definido como a concentração em que a frequência ventilatória e o consumo de O<sub>2</sub> não são modificados (Valverde et al., 2006).

Alguns peixes (*Brycon sp*, *Colossoma macropomum* e *C. bidens*) são capazes de desenvolver, em poucas horas, uma expansão da derme do maxilar inferior, quando o ambiente torna-se crítico em relação a concentração de O<sub>2</sub>, o que possibilita um melhor aproveitamento do O<sub>2</sub> da camada superficial da água (Esteves, 1998).

Muitos peixes mostram uma redução na frequência cardíaca e um aumento na ventilação durante a hipóxia. A bradicardia é usualmente compensada por um aumento do volume de sangue bombeado (Randall, 1982). Essa resposta aumenta a captação de O<sub>2</sub> devido à alta pressão que distende a lamela branquial, conduzindo a uma maior distribuição do fluxo sanguíneo intralamelar (Farrel et al., 1980), e à abertura das lamelas fechadas, aumentando a perfusão branquial (Farrel et al., 1979). Mudanças ambientais podem levar a novas demandas respiratórias e osmorregulatórias, que além de ajustes circulatórios, alteram a estrutura das brânquias (Sollid & Nilsson, 2006). Mudanças na composição ou morfologia das células dos filamentos branquiais interferem em vários processos fisiológicos e metabólicos, como o equilíbrio ácido-básico, a ionorregulação e eliminação de excretas nitrogenados. Populações de ciclídeos africanos ou ciprinídeos adaptados a ambientes hipóxicos ou que cresceram nesses ambientes, têm maior área superficial do que aqueles que vivem em ambientes normóxicos (Schaack & Chapman, 2003)



Além da respiração, as brânquias são o principal sítio de osmoregulação, pois para efetivar seu papel respiratório, apresentam uma extensa área superficial e pequenas distâncias de difusão que provêm à permeabilidade requerida para essa função. Entretanto, em teleósteos dulciaquícolas isso também pode aumentar a perda iônica difusiva e do ganho osmótico de água (Wood et al., 2007). É provável que o recrutamento lamelar e a vasodilatação branquial, que ocorrem durante a hipóxia para sustentar a captação de  $O_2$ , aumentem a taxa de efluxo de íons e a diluição do plasma. Além disso, é provável que a taxa de influxo ativo, que é realizado pelos ionócitos, também seja diminuída em função da falta de  $O_2$  para o transporte ativo nessas células, como também a menor atividade da  $Na^+K^+ATPase$ , como forma de minimizar o custo metabólico (Wood et al., 2007).

O custo energético da ionoregulação é estimado em 2-20% do total do metabolismo, podendo ser ainda maior dependendo da dureza da água. Ao nível celular o custo da ionoregulação só é menor do que a síntese protéica, e ambos os processos são minimizados durante a hipóxia em animais que são capazes de diminuir o metabolismo (hipometabolismo) nessa situação, como *Carassius carassius* (Hochachka & Lutz, 2001).

As brânquias excretam mais de 80% da amônia produzida a partir do metabolismo em peixes, sendo que o mecanismo para isso, provavelmente esteja ligado a captação ativa de  $Na^+$  (Wood, 1993; Wilkie 1997, 2002), diretamente pelo transporte acoplado  $Na^+/NH_4^+$  (Wright & Wood, 1985) ou indiretamente por outros mecanismos. Uma bomba de  $H^+$  na membrana apical provém o gradiente necessário para a captação de  $Na^+$  a partir da água, associada a acidificação da camada externa da membrana branquial, favorecendo a transformação de  $NH_3$  em  $NH_4^+$ , garantindo desse modo, o gradiente difusivo da  $NH_3$  (Lin & Randall, 1995). Durante a hipóxia, a excreção da amônia diminui e não está acoplada a captação de  $Na^+$ , e as mudanças nos níveis de amônia no plasma indicam que os processos de excreção ou produção estão bastante diminuídos (Wood, 2007).

O  $Ca^{2+}$  influi na permeabilidade das membranas biológicas e por isso, pode exercer papel fundamental na prevenção do efluxo difusivo e da alta perda iônica que podem aumentar durante situações de queda nas concentrações de  $O_2$  na água (Wurt & Durborow, 1992; Gonzales, 1996). A elevação do cálcio ambiental aumenta a tolerância do peixe a várias substâncias tóxicas, como à amônia, provavelmente por diminuir a permeabilidade da membrana branquial a este excreta (Tomasso et

al., 1980; Baldisserotto, 2002). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  induz a um aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  através do aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , compensando a depleção plasmática desse íon, e desse modo, aumenta a tolerância do peixe à  $\text{NH}_3$  (Walsh et al., 2007). O  $\text{Ca}^{2+}$  na dieta, em níveis adequados, também pode melhorar o desempenho de várias espécies na regulação iônica, especialmente em águas com baixa dureza, pois os peixes utilizam esse suprimento dietético para controlar o fluxo difusivo de íons pelas brânquias. Se houver diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na água, poderá haver uma limitação no crescimento, já que o íon oriundo da dieta será utilizado primariamente para regulação osmótica. Assim, pode ser viável incrementar a utilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na ração, pois as quantidades utilizadas são menores do que as que seriam empregadas para aumentar os níveis de dureza da água, diminuindo custos (Rodgers, 1984; Ferreira & Baldisserotto, 2007).

A diminuição do crescimento, causada pela hipoxia pode ser explicada pelo aumento do custo energético para a ventilação, diminuindo, dessa forma, a energia disponível para esse processo (Kramer, 1987) ou ainda, pela diminuição da ingestão de alimento (Brett, 1979; Kramer, 1987; Jobling, 1994; Pichavant et al., 2001). Para a maioria das espécies a procura do alimento, a digestão e a absorção podem representar até 60% do gasto energético (Van Dam & Pauly, 1995). Em muitas espécies a ingestão de alimento é muito reduzida em situações de hipoxia (Tretmeyer et al., 1999; Pichavant et al., 2001). Essa diminuição pode ser um mecanismo indireto através do qual a hipoxia crônica reduz o crescimento em *Dicentrarchus labrax* e *S. maximus*. A diminuição da ingestão provavelmente reduz a demanda energética e conseqüentemente o requerimento de  $\text{O}_2$  (Pichavant et al., 2001).

O jundia, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) é uma espécie endêmica desde o sul do México até a região central da Argentina (Silfvergrip, 1996) que apresenta rápido crescimento, mesmo nas baixas temperaturas observadas no inverno na região sul do Brasil, reproduzindo-se praticamente ao longo de todo o ano, com exceção dos meses mais frios (junho a agosto), sendo uma espécie apropriada para a produção em regiões onde o clima temperado e subtropical é predominante (Barcellos et al., 2003). Muitos estudos já foram realizados em relação ao efeito dos parâmetros de qualidade da água para o cultivo de jundia, como pH (Zaions & Baldisserotto, 2000; Lopes, Silva & Baldisserotto, 2001), salinidade (Gomes et al., 1999; Marchioro & Baldisserotto, 1999), níveis de amônia (Miron,

2004, 2007). dureza da água (Towsend & Baldisserotto, 2001; Silva et al., 2003, 2005; Towsend, Silva & Baldisserotto, 2003) dentre outros.

Em relação ao oxigênio dissolvido, Braun et al. (2006), verificaram que para juvenis (5,28±0,09 cm e 2,23±0,13 g) a  $CL_{50-96h}$  foi de 0,52 mg/L e que juvenis expostos a baixas concentrações de  $O_2$  (1,96±0,08; 3,10±0,10; e 4,14±0,09% da saturação) mostraram baixo consumo alimentar, menor ganho de peso, biomassa e taxa de crescimento específico do que expostos a maiores concentrações de  $O_2$  dissolvido (5,2±1,1 e 65,6% da saturação).

Para a dureza, Towsend et al. (2003) verificaram que níveis de dureza entre 30 e 70  $mg.L^{-1}$   $CaCO_3$  promoveram um bom crescimento e ganho de biomassa para larvas de jundiá. Nesse trabalho, os maiores níveis de dureza (300 e 600  $mg.L^{-1}$   $CaCO_3$ ) causaram baixa sobrevivência (1,0±0,8 e 0,3±0,3% respectivamente) das larvas no primeiro dia, enquanto que em larvas mantidas em 150  $mg.L^{-1}$   $CaCO_3$  a sobrevivência ficou em 8,7±0,9% durante a primeira semana de experimento. As larvas expostas a 30  $mg/L$   $CaCO_3$  apresentaram maiores taxas de sobrevivência (80,4±4,1%).

O presente trabalho verificou a influência da concentração de  $O_2$  da água na sobrevivência e crescimento de juvenis de jundiá, bem como a eficiência do  $Ca^{2+}$ , na água ou na ração, para minimizar os possíveis efeitos nocivos da hipóxia.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais Experimentais**

Os juvenis de jundiá foram adquiridos em pisciculturas da região de Santa Maria RS, Brasil e transportados ao Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria. Os peixes foram mantidos por 7 dias em tanques de 250 L, com aeração constante, à temperatura de 25°C, nível de oxigênio dissolvido em 6,0 mg/L e alimentados com ração comercial para juvenis com 28% de proteína bruta a 2% da massa corporal por dia.

## 2.2 Análises de Qualidade de Água

Para manter os níveis de O<sub>2</sub> a aeração foi efetuada com ar e/ou nitrogênio. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos com oxímetro (modelo Y552, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) e os níveis de pH com pHmetro DMPH-2 (Digimed, São Paulo, Brasil). A amônia total foi determinada por Nesslerização (Greenberg et al., 1976) e a amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) foi determinada de acordo com Piper et al. (1982). A dureza da água foi analisada através do método titrimétrico com EDTA e a alcalinidade de acordo com Boyd & Tucker (1992).

## 2.3 CL<sub>50-96h</sub> O<sub>2</sub> X Ca<sup>2+</sup> na Dieta

Os juvenis ( $4,75 \pm 0,65$  g e  $7,56 \pm 0,61$  cm) foram distribuídos em caixas de polipropileno de 2 L, numa densidade de 9 juvenis por caixa. O experimento foi conduzido com 5 concentrações de O<sub>2</sub> ( $0,41 \pm 0,13$ ;  $0,71 \pm 0,15$ ;  $0,97 \pm 0,13$ ;  $1,44 \pm 0,35$  e  $6,41 \pm 0,60$  mg/L) e 4 níveis de Ca<sup>2+</sup> na ração (0,45; 0,95; 1,45 e 2,5%).

Todas as dietas foram preparadas de acordo com Lazzari (2005) e incluíram farinha de carne, ossos e de soja como os principais ingredientes. As dietas apresentaram 34% de proteína bruta, 3400 kcal/kg e 3% de fibra bruta. Os ingredientes foram misturados e hidratados. Para preparar as dietas de cada tratamento foi adicionado CaCO<sub>3</sub> à pasta da dieta controle (0,45% Ca<sup>2+</sup>) produzindo as dietas experimentais. A pasta resultante foi misturada e extruzada, secada e triturada em pequenos “pellets”. A medida das concentrações de Ca<sup>2+</sup> nas quatro dietas (0,45; 0,95; 1,45 e 2,45%) foram (média±EP)  $3 \pm 0,1$ ;  $31 \pm 0,6$ ;  $63 \pm 1,3$ ;  $127 \pm 1,3$  e  $151 \pm 1,3$  mmol/kg respectivamente. Os peixes foram alimentados (2% da massa corporal/dia) com as dietas experimentais durante 5 dias antes do início do experimento.

A temperatura ( $26 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ) e o pH (7,16 à 8,55) foram verificados a cada 12 horas e o oxigênio dissolvido a cada 6 horas. A dureza (26 mg CaCO<sub>3</sub>/L) e a alcalinidade ( $30,33 \pm 3,75$  mg CaCO<sub>3</sub>/L) foram verificadas no início e no final do experimento.

## 2.4 CL<sub>50-96h</sub> O<sub>2</sub> X Dureza da Água

Os juvenis ( $3,66 \pm 0,75$  g e  $7,32 \pm 0,5$  cm) foram distribuídos em caixas de polipropileno de 2 L, numa densidade de 10 juvenis por caixa. O experimento foi conduzido com 5 concentrações de O<sub>2</sub> ( $0,27 \pm 0,10$ ;  $0,74 \pm 0,26$ ;  $1,33 \pm 0,14$ ;  $1,74 \pm 0,32$  e  $6,55 \pm 0,02$  mg/L) e quatro níveis de dureza na água (28, 116, 116 e 180 mg CaCO<sub>3</sub>/L). A dureza foi aumentada adicionando-se CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a água.

A temperatura ( $25,6 \pm 0,5$ °C) e o pH (7,17 a 7,83) foram verificados a cada 12 horas e o oxigênio dissolvido a cada 6 horas. A alcalinidade ( $30,33 \pm 3,75$  mg CaCO<sub>3</sub>/L) e a dureza, no início e final do experimento.

Durante o experimento os juvenis foram alimentados com ração comercial (28% PB) com 2% da massa corpora/dia. O alimento não ingerido era retirado após 30 minutos com uma peneira.

Nos dois experimentos, os tratamentos foram realizados com 3 repetições cada. Em ambos, a cada 12 horas a mortalidade verificada e a água das caixas foi totalmente trocada por uma com as condições dos respectivos tratamentos. A CL<sub>50-96h</sub> O<sub>2</sub> foi calculada através do método de probits (Finney, 1971). Durante os experimentos foram observados o comportamento alimentar (alimentavam-se ou não) e natação (desequilíbrio, letargia).

## 2.5 Experimento de Crescimento (O<sub>2</sub> X dureza)

Juvenis ( $3,49 \pm 1,0$ g e  $6,9 \pm 0,8$ cm) foram expostos a  $1,47 \pm 0,04$  mgO<sub>2</sub>/L e outro grupo ( $2,12 \pm 0,21$ g e  $6,0 \pm 0,26$ cm) a  $6,46 \pm 0,06$  mgO<sub>2</sub>/L (próximo à saturação), sendo que ambos grupos foram expostos a 4 níveis de dureza:  $30 \pm 2,0$ ;  $61 \pm 2,5$ ;  $121 \pm 3,0$  e  $180 \pm 3,0$  mg CaCO<sub>3</sub>/L, com três repetições em cada tratamento e a densidade foi de 10 juvenis/caixa. Os peixes foram alimentados com ração comercial 28% PB, a 2% da massa corporal/dia.

A temperatura ( $22,4 \pm 0,6$  °C), o pH ( $7,45 \pm 0,04$ ), e oxigênio dissolvido foram verificados duas vezes por dia, enquanto que a alcalinidade ( $22,6 \pm 2,57$  mg/L CaCO<sub>3</sub>) e o nitrito (nível máximo de 0,29 mg/L) três vezes por semana. Todos os dias foram removidos os restos de alimento e fezes, e 90% da água trocada por uma de igual qualidade de acordo com os tratamentos.

Foi realizada uma biometria aos 15 dias após o início do experimento. A taxa de crescimento específico (G) foi calculada conforme a equação:

$$G = [(ln W_2 - ln W_1)/(t)] * 100$$

onde  $W_1$  e  $W_2$  são a massa corporal no início e no final do período, e  $t$  refere-se ao comprimento (Jørgensen & Jobling, 1993). A biomassa final foi calculada multiplicando-se a média de peso ao final dos 15 dias pelo número de sobreviventes. O coeficiente de variação (K) de peso e comprimento foi calculado de acordo com a equação:

$$CV = (SD/X) * 100,$$

onde SD é o desvio padrão e X é a média do comprimento ou peso (Jobling, 1994).

O fator de condição (K) foi calculado de acordo com a equação

$$K = (W/L^3) * 100,$$

onde  $W$  é a massa corporal dos peixes e  $L$  o comprimento (Jobling, 1994).

Ao longo do experimento foram observados o comportamento alimentar (alimentavam-se ou não), a natação (equilíbrio, letargia) e a mortalidade.

## 2.6 Análise Estatística

Todos os resultados foram avaliados estatisticamente através de regressão linear, ANOVA e teste de Tukey utilizando os programas Sigma Plot (versão 8.0) e Biostat 4.0 (2005), com nível mínimo de significância de 95% ( $P < 0.05$ ).

## 3 Resultados

### 3.1 $CL_{50-96h}$ $O_2$ e Diferentes Níveis de $Ca^{2+}$ na Dieta

A mortalidade dos juvenis expostos a  $0,43 \pm 0,03$  mg $O_2$ /L e alimentados com níveis de 0,45 e 2,45% de  $Ca^{2+}$  na ração foi significativamente maior (92,5 e 85,1%, respectivamente) do que naqueles que receberam dietas com 0,95 e 1,45% de  $Ca^{2+}$

(62,9 e 51,8% respectivamente). Na concentração de  $0,64 \pm 0,05$  mgO<sub>2</sub>/L, não houve diferença entre os tratamentos. Nessas duas concentrações de O<sub>2</sub> a taxa de mortalidade foi maior nas primeiras 36 horas após o início do experimento. Na concentração de  $0,8 \pm 0,02$  mgO<sub>2</sub>/L, a maior mortalidade ocorreu no tratamento com 2,45% de Ca<sup>2+</sup> na dieta (85,1%), sendo significativamente menor nos outros níveis de Ca<sup>2+</sup>, de 1,37% para 0,95% de Ca<sup>2+</sup>, e 33,3% para 1,45% de Ca<sup>2+</sup>. No nível de 0,45% de Ca<sup>2+</sup> não houve mortalidade. Na concentração de  $1,07 \pm 0,09$  mgO<sub>2</sub>/L as maiores taxas de mortalidade ocorreram nos tratamentos com 0,45 e 2,45% de Ca<sup>2+</sup> na dieta (70,3 e 55,5%, respectivamente) e nos níveis de 0,95 e 1,45% de Ca<sup>2+</sup>, a mortalidade foi de 7,4 e 3,7%. Não houve mortalidade no tratamento controle ( $6,43 \pm 0,20$ ) (Tabela 1). A CL<sub>50-96</sub> para os diferentes níveis de oxigênio dissolvido foi de 0,89 mg/L (IC 0,64–1,34 mg/L).

### **3.2 CL<sub>50-96h</sub> O<sub>2</sub> Diferentes Níveis de Dureza na Água**

A mortalidade dos juvenis expostos a concentração de  $0,27 \pm 0,10$  mgO<sub>2</sub>/L foi entre 66,67 e 73,33% para as durezas de 28, 52 e 116 mg CaCO<sub>3</sub>/L e de 33,3% na dureza de 180 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Na concentração de  $0,74 \pm 0,26$  mgO<sub>2</sub>/L a taxa de mortalidade foi significativamente maior no tratamento com a dureza de 28 mg CaCO<sub>3</sub>/L (90%) do que nos tratamentos com 52, 116 e 180 mg CaCO<sub>3</sub>/L (30,0; 36,7 e 23,3%, respectivamente). Já na concentração de 1,33 mgO<sub>2</sub>/L a mortalidade foi de 30% nos tratamentos com 28 e 180 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 10% no tratamento com dureza 52 mgCaCO<sub>3</sub>/L e no tratamento com dureza 116 mg CaCO<sub>3</sub>/L não houve mortalidade. Na concentração  $1,74 \pm 0,32$  mgO<sub>2</sub>/L e no controle ( $6,55 \pm 0,02$  mgO<sub>2</sub>/L) também não houve mortalidade.

Tabela 1 –  $CL_{50-96h}$   $O_2$  para juvenis de jundia (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes níveis de  $Ca^{2+}$  na dieta e dureza na água.

Níveis de $Ca^{2+}$ na dieta	$CL_{50-96h}$	Níveis de dureza	$CL_{50-96h}$
0,45	$0,93 \pm 0,19^a$	28	$0,96 \pm 0,07^a$
0,95	$0,64 \pm 0,09^b$	52	$0,49 \pm 0,09^b$
1,45	$0,66 \pm 0,09^b$	116	$0,78 \pm 0,08^a$
2,45	$1,34 \pm 0,07^c$	180	Nd

Diferentes letras indicam diferença significativa através de análise de variância (ANOVA "Two-Way") e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). nd – não determinado, pois mortalidade foi baixa nos níveis de  $O_2$  testados.

### 3.3 Interação entre $O_2$ x Dureza da Água e Crescimento

Os juvenis expostos a menor concentração de  $O_2$  ( $1,47 \pm 0,04$  mg $O_2$ /L) tiveram um aumento nos parâmetros: peso médio final, ganho de peso, ganho de biomassa, comprimento e taxa de crescimento específico, enquanto que para o fator de condição não houve diferença significativa. Houve um aumento proporcional do seu desempenho de acordo com o nível de dureza. Os peixes expostos ao nível mais alto de  $O_2$  ( $6,46 \pm 0,06$  mg $O_2$ /L) apresentaram menor desempenho para essas variáveis, sendo que houve diminuição das taxas de crescimento na medida em que houve aumento da dureza. Os peixes expostos a menor concentração de  $O_2$  mostraram sinais de letargia durante todo o período avaliado. A taxa de sobrevivência foi de 100% em ambos tratamentos.



Tabela 2 – Ganho de peso (g/15 dias), ganho de biomassa (g/15 dias), taxa de crescimento específico (%dia), fator de condição (g/cm<sup>3</sup>) e comprimento (cm) de juvenis de jundiá expostos a diferentes concentrações de O<sub>2</sub> e dureza na água após 15 dias.

Níveis de O <sub>2</sub> (mg/L)		Dureza (mgCaCO <sub>3</sub> /L)			
		30±2,0	61±2,5	121±3,0	180±3,0
1,47±0,04	Ganho de peso	1,42±0,08 <sup>a</sup>	1,77±0,04 <sup>b</sup>	2,24±0,70 <sup>c</sup>	3,78±0,39 <sup>d</sup>
	Ganho de Biomassa	14,16±0,76 <sup>a</sup>	17,65±0,40 <sup>b</sup>	22,40±7,03 <sup>c</sup>	37,79±3,88 <sup>d</sup>
	Taxa de Crescimento Específico	4,72±0,18 <sup>a</sup>	5,58±0,13 <sup>a</sup>	5,98±0,95 <sup>a</sup>	9,18±0,70 <sup>b</sup>
	Fator de Condição	1,31±0,01	1,33±0,03	1,20±0,13	1,44±0,10
	Comprimento	7,2±0,06	7,33±0,03	7,87±0,12	7,97±0,03
	6,46±0,06	Ganho de peso	1,27±0,33 <sup>a</sup>	1,28±0,14 <sup>a</sup>	0,73±0,12 <sup>b</sup>
Ganho de Biomassa		12,67±1,57 <sup>a</sup>	12,80±1,92 <sup>a</sup>	7,31±0,49 <sup>b</sup>	6,34±0,63 <sup>b</sup>
Taxa de Crescimento Específico		-9,73±0,37	-9,72±0,57	-9,49±0,45	-9,18±0,78
Fator de Condição		1,05±0,20	0,94±0,09	0,89±0,19	0,92±0,11
Comprimento		6,86±0,25	7,13±0,32	6,83±0,21	6,69±0,29

\*todos os valores estão expressos como média ± erro padrão (n= 10)

\*\*Peso inicial: 1,47±0,04 mg O<sub>2</sub>/L= 3,49 g ; 6,46±0,06 mgO<sub>2</sub>/L = 2,12g

Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas através de análise de variância (ANOVA "Two-Way") e teste de Tukey (P<0,05)

O ganho de peso, biomassa e o comprimento ao final do experimento foram significativamente maiores nos juvenis expostos a menor concentração de O<sub>2</sub> do que os peixes expostos a maior concentração de O<sub>2</sub>. O aumento da dureza da água prejudicou todos os parâmetros medidos nos juvenis expostos a maior concentração de O<sub>2</sub>, enquanto que para aqueles submetidos a baixos níveis de O<sub>2</sub>, houve um incremento nesses mesmos parâmetros (Figura 1).

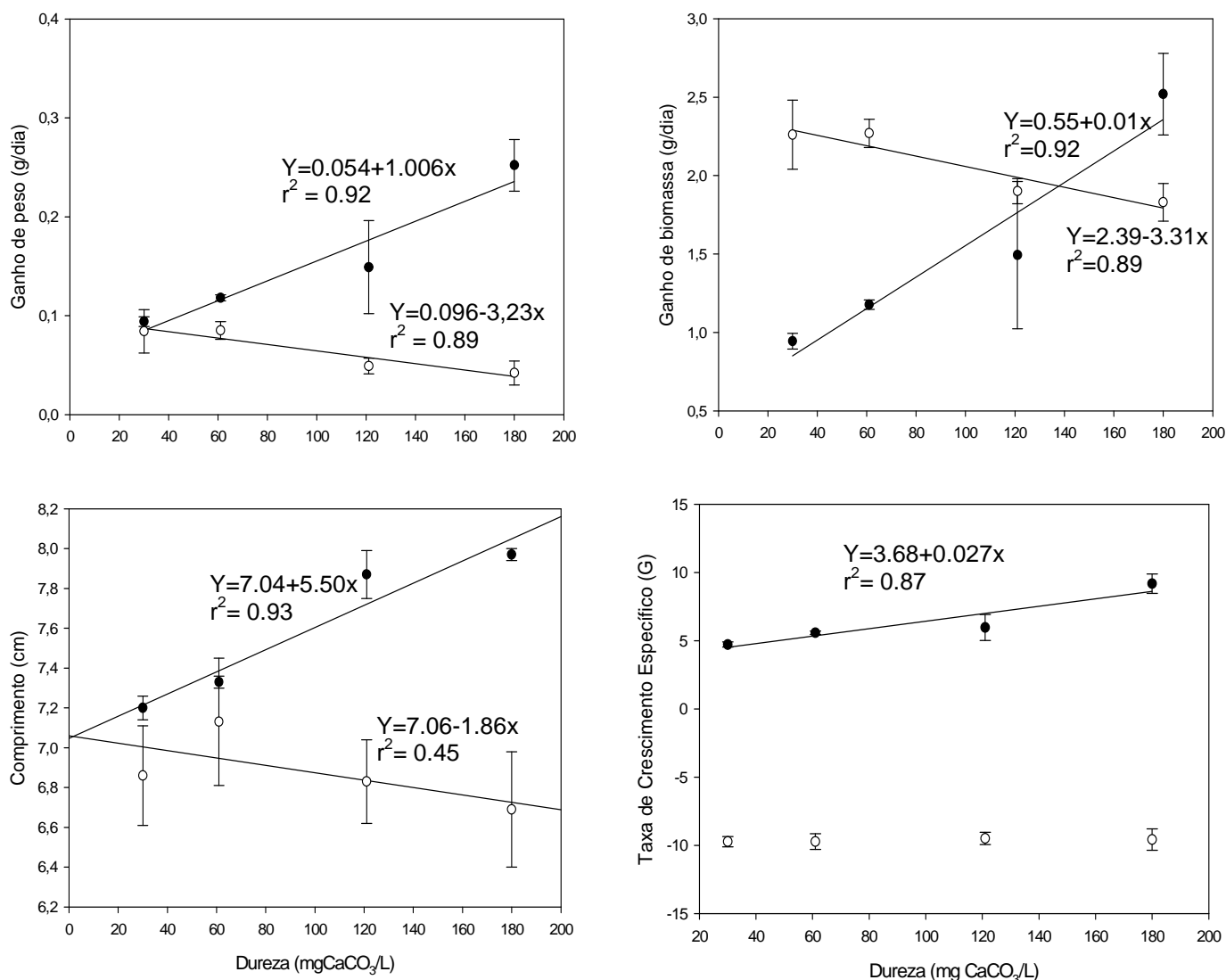


FIGURA 1 – Ganho de peso (A), ganho de biomassa (B), comprimento (C) e Taxa de crescimento específico(D) de juvenis de jundiá expostos a diferentes níveis de oxigênio dissolvido e durezas na água por 15 dias (● = 1.47 e ○ = 6.46 mg/LO<sub>2</sub>).

#### 4 DISCUSSÃO

Os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido na água têm um papel chave na qualidade da água para aqüicultura. Diferentes espécies de peixes apresentam variadas estratégias para superar as baixas concentrações de oxigênio na água. Dentre os mecanismos mais usados pelos peixes está o aumento da frequência e do volume ventilatório (Randall, 1982). Em situações de hipóxia, o custo da ventilação pode aumentar até 50% do custo ventilatório em normóxia (Valverde et al., 2006). O aumento do custo energético para a ventilação diminui a energia disponível para o crescimento e outras funções (Kramer, 1987). Para várias espécies o crescimento é bastante

prejudicado em situações de hipóxia. Juvenis de *Leporinus elongatus* (28-51g) expostos à hipóxia severa ( $1,92 \pm 0,09$  mgO<sub>2</sub>/L) por 14 dias mostraram baixo ganho de peso, conversão alimentar e índice hepatossomático quando comparados aos submetidos a hipóxia moderada ( $3,91 \pm 0,09$  mgO<sub>2</sub>/L) e normóxia (Wilhelm Filho et al., 2005).

Para um grande número de telosteos, pequenos indivíduos são mais tolerantes à hipoxia que grandes indivíduos (Burlison et al., 2001; Robb & Abrahams, 2003). Entretanto, para *A. ocellatus*, Almeida-Val et al. (2000) relatam que juvenis (16 g) sobreviveram satisfatoriamente à hipóxia severa por apenas 9 horas enquanto que indivíduos maiores (230 g) sobreviveram aproximadamente 35 horas. Nessa espécie, a maior tolerância a hipóxia deve-se ao grande potencial anaeróbico, o qual é indicado pelas concentrações de lactato desidrogenase e malato desidrogenase em vários tecidos, indicando que os adultos são fisiologicamente adaptados para condições de hipóxia.

Em nossos experimentos, juvenis de jundiá expostos a concentrações muito baixas de O<sub>2</sub> (nos experimentos de CL<sub>50-96h</sub>) exibiram estratégias para minimizar os efeitos da hipóxia, como buscar pelo oxigênio na superfície da água e aumento dos movimentos operculares (frequência e volume ventilatório), o que também foi verificado por Braun et al. (2006). Esse comportamento também foi verificado em outras espécies, como *Ictalurus punctatus* (Burlison et al., 2002), *Prochilodus lineatus* (Parma-de-Crouz, 1995) e *O. niloticus* (Delaney & Klesius, 2004). Para a maioria das espécies níveis inferiores a 3 mg/L podem ser muito estressantes, e se as concentrações de O<sub>2</sub> ficam abaixo de 1 mg/L, os animais são incapazes de obter o O<sub>2</sub> necessário e suas funções vitais são afetadas, podendo levá-los à morte (Boyd & Tucker, 1992; Baldissertotto, 2002). O grumatã, *P. lineatus*, após 3-4 horas de exposição a 0,3-0,5 mg/L de O<sub>2</sub>, apresentou 100% de mortalidade (Parma-de-Corux, 1995), enquanto que *A. ocellatus*, considerada uma espécie tolerante à hipóxia, sobreviveu a 0,4 mg/L O<sub>2</sub> por 16 horas (Muusze et al., 1998).

Juvenis de *D. labrax* expostos à hipóxia tiveram uma marcada diminuição no crescimento (Pichavant et al., 2001). Esse efeito pode ser atribuído ao aumento no custo energético para ventilação com conseqüente diminuição da energia disponível para crescimento (Kramer, 1987) ou uma diminuição na ingestão de alimento (Brett, 1979; Kramer, 1987; Jobling, 1994; Pichavant et al., 2001). O processo de

alimentação, digestão e absorção é altamente dispendioso para os peixes, podendo representar 60% do gasto total do animal (Vam Dam & Pauly, 1995).

Como em muitas espécies, os juvenis de jundiá expostos a baixas concentrações de  $O_2$  mostraram menor voracidade (menor consumo aparente) que os expostos a níveis mais altos de  $O_2$ , o que causou um menor ganho de peso, comprimento, biomassa e taxa de crescimento específico (Braun et al. 2006). Entretanto, em nosso experimento de crescimento todas as variáveis avaliadas foram significativamente maiores nos juvenis expostos a menor concentração de  $O_2$  que os peixes expostos a maior concentração de  $O_2$ . O aumento da dureza da água parece ter melhorado os parâmetros medidos, enquanto que para aqueles submetidos a níveis mais altos de  $O_2$ , houve uma diminuição nesses mesmos parâmetros.

Baixas concentrações de  $Ca^{2+}$  na água (0,125 mM) e na dieta reduzem a taxa de crescimento em *Salvelinus fontinalis* (Rodgers, 1984) demonstrando que um mínimo de captação de  $Ca^{2+}$  através das brânquias e/ou intestino é necessária para um crescimento normal dos peixes (Baldisserotto et al., 2004).

Os efeitos da dureza da água sobre o crescimento variam de acordo com a espécie de peixe e a qualidade da água. Espécies que são encontradas em ambientes naturais de água dura requerem a mesma qualidade para um bom desenvolvimento, enquanto que para aquelas encontradas naturalmente em águas moles, águas duras podem ocasionar efeitos deletérios prejudicando seu crescimento e sobrevivência (Parra & Baldisserotto, 2007).

O  $Ca^{2+}$  na água ou na dieta pode exercer um papel fundamental na regulação iônica, evitando a perda de íons por difusão, pois interfere na permeabilidade das membranas biológicas, aumentando a tolerância dos teleósteos dulciaquícolas a várias substâncias tóxicas, como metais pesados (Baldisserotto et al., 2004) e a amônia (Tomasso et al., 1980; Walsh et al., 2007).

Várias pesquisas mostram que o  $Ca^{2+}$  tem um importante papel na manutenção da homeostasia (Tomasso, 1980.; Yesaki & Iwama, 1992), pela manutenção da integridade das junções celulares, na permeabilidade das membranas, na regulação das bombas de prótons (Wright & Wood, 1985.; Lin & Randall, 1991; Yesaki & Iwama, 1992; Wilson et al., 1994)

O presente estudo indica que altas concentrações de  $Ca^{2+}$  na água podem melhorar a crescimento de juvenis de jundiá expostos a baixos níveis de  $O_2$  na água.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo auxílio MCT/SEAP/FINEP - AQUICULTURA – Ação Transversal 12/2005. B. Baldisserotto e R. B. Cunha receberam bolsas produtividade CNPq e de iniciação científica FAPERGS, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; DUNCAN, W.P., SOUZA, F.C.A.; PAULA-SILVA, M.N.; LAND, A. Scalling effects on hypoxia tolerance in Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes, Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 125B, 219-226. 2000.
- ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis, EDUFSC, 231p. 2004.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria. EDUFMS. 2002.
- BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M.; SALOMÃO, L.C. Effect of pH on ion and water transport in the gut of freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. **Ciência e Cultura**, 45: 396–398. 1993.
- BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M. Ion and water transport in the gut on the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. **Ciência e Cultura**, 47: 83–85. 1995.
- BALDISSEROTTO, B.; KAMUNDE, C.; MATSUO, A.Y.O.; WOOD, C.M. Acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout is reduced by dietary calcium carbonate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, C137: 363–372. 2004.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after harvest acute stress. **Aquaculture Research**, v.34, n.14, p.1465-1469. 2003.
- BIJVELDS, M.J.C., VAN DER VELDEN, J.A.; KOLAR, Z.; FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. **Journal of Experimental Biology**, 201: 1981–1990. 1998.
- BOGÈ, G.; LOPES, L.; PÉRÈS, G. An *in vivo* study of the role of pyloric caeca in water absorption in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 91: 9–13. 1988.
- BOYD, C. and TUCKER, C.S. **Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture**. Auburn University, Auburn, Al, USA. 183pp. 1992.
- BRAUN, N.; LIMA, R.L.; MORAES, B.; LORO, V.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy &

Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, 37, 1524-1531. 2006.

BRETT, J. R.; BLACKBURN, J. M. Oxygen requirements for growth of young coho (*Oncorhynchus kisutch*) and sockeye (*O. nerka*) salmon at 15°C. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 38, 399–404. 1981.

BUDDIGTON, R.K.; CHEN, J.W.; DIAMOND, J. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. **Journal of Physiology**, 393: 261–281. 1987.

BURLESON, M.L.; CARLTON, A.L.; SILVA, P.F. Cardioventilatory effects of acclimatization to aquatic hypoxia in channel catfish. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. 131, 223-232. 2002.

BURLESON, M.L.; WILHELM, D.R.; SMATRESK, N.J. The influence of fish size on the avoidance of hypoxia and oxygen selection by largemouth bass. **Journal Fish Biology**. 59, 1336-1349. 2001.

CRAPTON, W.G.R. Effects of anoxia on distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. **Journal of Fish Biology**, 53: 305-330, 1998.

DABROWSKI, K.; LERAY, C.; NONNOTTE, G.; COLIN, D.A. Protein digestion and ion concentration in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) digestive tract in sea and freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, A83: 27–39. 1986.

DELANEY, M.A.; KLESIOUS, P.H. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**. 236, 633-644. 2006.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro, Interciência. 602 p. 1998.

FARREL, A.P.; DAXBOECK, C.; RANDAL, D.J. The effects of input pressure and flow on the pattern and resistance to flow in the isolated perfused gill of a teleost fish. **Journal Comparative Physiology**. 133, 233-240. 1079.

FARREL, A.P.; SOBIN, S.S.; RANDALL, D.J.; CROSBY, S. Intralamellar blood flow patterns in fish gill. **American Journal Physiology**. 239, R428-R436. 1980.

FERNANDES, M.N.; SANCHES, J.R.; MATSUZAKI, M.; PANEPUCCI, L.; RANTIN, F.T. Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. **Biology of tropical fishes**. Manaus, INPA. P.341-352. 1999.

FLIK, G.; VAN DER VELDEN, J.A.; DECHERING, K.J.; VERBOST, J.M.; SCHOENMAKERS, J.M.T.H.; KOLAR, Z.I.; WENDELAAR BONGA, S.E. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: A review. **Journal of Experimental Zoology** 265: 356–366. 1993a.

FLIK, G.; AT SMA, W.; FENWICK, J.C.; RENTIER-DELRUE, F.; SMAL, J.; WENDELAAR BONGA, S.E.. Homologous recombinant growth hormone and calcium metabolism in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, adapted to fresh water. **Journal of Experimental Biology**, 185: 107–119. 1993b.

FLIK, G.; VERBOST, P.M. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, pp. 251–263. 1995.

FLIK, G.; KLAREN, P.H.M.; SCHOENMAKERS, T.J.M.; BIJVELDS, M.J.C.; VERBOST, P.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Cellular calcium transport in fish: Unique and universal mechanisms. **Physiological Zoology**, 69: 403–417. 1996.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.I; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Effect to salt in the water for transport on survival and on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels of silver catfish, *Rhamdia quelen* fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, n. 4, p. 1-9. 1999.

GONZALES, R.J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. In: VAL, A.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. **Physiology and Biochemistry of Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto de Pesquisas da Amazônia, 420p. 1996.

GREENBERG, A.E.; TARAS, M.J. and RAND, M.C. **Standart Methods for examination of water and wastewater**. 14<sup>th</sup> edn. Bru-El Graphic Inc., Springfield, 1193p. 1976

HOCHACHKA, P.W. Oxygen sensing and metabolic regulation: short, intermediate, and long term roles. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. & Randall, D.J. (Eds). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus, INPA. 233-253. 1996).

HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 139B, 435-459. 2001.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman & Hall. 1994.

KERSTETTER, T.H.; WHITE, R.J. Changes in intestinal water absorption in coho salmon during short-term seawater adaptation: A developmental study. **Aquaculture**, 121: 171–180. 1994.

KRAMER, D.L. Dissolved oxygen and fish behavior. **Environmental Biology of Fishes**. 18, 81-92. 1987.

LIN, H.; RANDALL, D.J. Proton pumps in fish gills. Pages 229-255 In: **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. Wood, C.M. and Shuttleworth (Eds). Acadêmic Press, London. 1995.

MAGAUD, H.; MIGEON, B.; MORFIN, P.; GARRIC, J. & VINVIMIAN, E. Modelling fish mortality due to urban storm run-off: interacting effects of hypoxia an un-ionized ammonia. **Water Resources**, 31, n. 2, p. 211-218, 1997.

MARCHIORO, M.I. & BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824. Pisces, Pimelodidae) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v. 29, nº2, p. 315 – 318, 1999.

MIRON, D.S. Efeito da amônia em diferentes níveis de pH da água na sobrevivência e no crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). 2004. 41f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria. 2004

MIRON, D.S.; MORAES, B.; BECKER, A.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. 2007. Interactions between water ammonia and pH on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture** (in press).

MUUSZE, B.; MARCON, J.; VAN DEN THILLART, G. ALMEIDA-VAL, V.M. Hypoxia tolerance of Amazonian fish – respirometry and energy metabolism of the cichlidae *Astronotus ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Molecular and Integrative Physiology**. 120, 151-156.

PARMA-DE-CROUX, M.J. Tolerância respiratória de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) a condições críticas de oxigênio. **Iheringia**. Série Zoologia. 79, 135-140. 1995.

PARRA, J.G.; BALDISSEROTTO, B. Effect of water hardness on survival and growth of freshwater teleost. In: Baldisserotto, B.; Mancera, J.M.; Kapoor, B.G. **Fish Osmoregulation**. Eds. Enfield, USA: Science Publisher. 2007.

PEDERSEN, C. L. Energy budgets for juvenile rainbow trout at various oxygen concentrations. **Aquaculture**, 62, 289–298. 1987.

PICHAVANT, K.; PERSON-LE-RUYET, J.; LE BAYON, N.; SEVERE, A.; LE ROUX, A.; BOEUF, G. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. **Journal of Fish Biology**, 59, 875–883. 2001.

PIPER, R.G.; McELWAIN, I.B.; McCRAREN, J.P. FOWLER, L.G. & LEONARD, J.R. 1982. **Fish Hatchery Management**. Washington: United States Department of Interior Fish and Wildlife Service, 517p.

RANDALL, D.J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **Journal Experimental Biology**. 100, 275-288. 1982.

ROBB, T.; ABRAHAMS, M.V. Variation in tolerance to hypoxia in a predator and prey species: an ecological advantage of being small? **Journal Fish Biology**. 62, 1067-1081. 2003.

RODGERS, D.W. Ambiente pH and Calcium Concentrations as Modifiers of Growth and Calcium Dynamics of Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science**, 41: 1774-1780. 1984.



- SCHAACK, S.; CHAPMAN, L.J. Interdemic variation in the African cyprinid *Barbus neumayeri*: correlations among hypoxia, morphology and feeding performance. **Canadian Journal Zoology**. 81, 430-440. 2006.
- SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, B. & BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, 228, 279 – 287, 2003.
- SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, J.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentration. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.2, p.299-304. 2005.
- STEFFENSEN, J.F. The transition from active to ram ventilation in fishes: energetic consequences and dependence on water oxygen tension, **Journal Experimental Biology**. 114, 141-150. 1985.
- STIFFLER, D.F.; GRAHAM, J.B.; DICKSON, K.A.; STOCKMANN, W. Cutaneous ion transport in the freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. **Physiological Zoology** 59: 406–418. 1986.
- SOLLID, J.; NILSSON, G.E. Plasticity of respiratory structures – Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Respiratory Physiology and neurobiology**, 154, 241-251. 2006.
- TOMASSO, J.R.; CHERVI, A.; GOUDIE, Bill; SIMCO, A.; DAVIS, K.B. Effects of Environmental pH and Calcium on Ammonia Toxicity in Channel Catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 109, p. 229 – 234. 1980.
- TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**, v.9, p.413-419. 2001.
- TOWNSEND, C.R.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different level of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p. 103-108. 2003.
- VALVERDE, J.C.; CEREZO, F.J.M.; GARCIA, B.G. Oxygen consumption and ventilatory frequency responses to gradual hypoxia in common dentex (*Dentex dentex*): basis for suitable oxygen level estimation. **Aquaculture**. 256, 542-551. 2006.
- VAN DAM, A.A.; PAULY, D. Simulation of effects of oxygen on feed intake and growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**. 26, 427-440. 1995.
- WALSH, P.J.; VEAUUVY, C.M.; MC DONALD, M.D.; PAMETER, M.E.; BUCK, L.T.; WILKIE, M.P. 2007. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 147, p.332-343.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R.C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status

in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**. 244, 349-357. 2005.

WILKIE, M.P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 118A, 39-50. 1997.

WILKIE, M.P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future challenges. **Journal Experimental Biology**. 293, 284-301. 2002.

WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.W.; Benson, W.H. (Eds). **Traget Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**, vol. 1, Organs, Taylor and Francis, Washington, DC. Pp. 1-89. 2001.

WOOD, C.M.; SLOMAN, K.A.; KAJIMURA, M.; JOHANSSON, O.E.; WALSH, P.J.; SCOTT, G.; WOOD, S. ; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L. Behavioral, respiratory, ionoregulatory, and N-metabolic adaptations to low environmental O<sub>2</sub> and the influence of body size in hypoxia-tolerant Amazonian oscar (*Astronotus acellatus*). In: **Fish Physiology, Toxicology and Water Quality** (Ed. By BRAUNER, C.J.; SUVAJDZIC, K.; NILSSON, G.; RANDAL, D.J. pp. 179-200. Proceedings in the Ninth International Symposium, Capri, Italy. 2006.

WRIGHT, P.A.; WOOD, C.M. An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: effects of environmental pH change and sodium uptake blockaden. **Journal Experimental Biology**. 114, 329-353. 1985

WURTS, W.A.; DURBOROW, R.M. Interaction of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. **Aquaculture Program SRAC publication**, 464 ed. 6p. 1992

ZAIONS, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1041-1045. 2000.

## CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos com esses trabalhos, conclui-se que

1. A média da concentração letal de amônia não ionizada, em 96 horas, para juvenis de jundia alimentados com dietas suplementadas em  $\text{Ca}^{2+}$ , foi de 0,73 mg/L  $\text{NH}_3$ . e para juvenis mantidos em diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na água foi de 1,20 mg/L  $\text{NH}_3$ .
2. A média da concentração letal de Oxigênio dissolvido, em 96 horas, para juvenis de jundia alimentados com dietas suplementadas em  $\text{Ca}^{2+}$ , foi de 0,89 mg/L  $\text{NH}_3$  e
3. O aumento dos níveis de dureza da água melhorou o crescimento de juvenis mantidos em altas concentrações de  $\text{NH}_3$  e baixas concentrações de  $\text{O}_2$  e podem ser prejudiciais em situações de concentrações baixas de  $\text{NH}_3$  na água e de normóxia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando se compara os efeitos da hipóxia e da alta concentração de amônia na água, verifica-se uma surpreendente interação entre esses estressores. Algumas espécies são bastante resistentes a baixos níveis de  $O_2$  e altos de  $NH_3$  (*I. punctatus* e *P. reticulata*, por exemplo) enquanto outras (*O. mykiss*, por exemplo), são muito sensíveis a esses parâmetros. A toxicidade da  $NH_3$  aumenta com a redução da concentração do  $O_2$  na água.

Dentre as adaptações que ocorrem durante a hipóxia crônica estão o aumento da ventilação (frequência e volume) e conseqüentemente da perfusão branquial, alterando as células branquiais, interferindo na osmoregulação e ionoregulação, no equilíbrio ácido-básico e na eliminação dos excretas nitrogenados. A captação ativa de  $Na^+$  ocorre acoplada a excreção de  $NH_3$ , de modo que, se durante a hipóxia ocorre diminuição da atividade dos ionócitos, por falta de  $O_2$ , diminui também a excreção de  $NH_3$ .

A exposição crônica a níveis altos de  $NH_3$  afeta os peixes de várias maneiras: causa hiperplasia branquial, mudanças na produção de muco, aumento da ventilação branquial. Essas alterações diminuem a captação branquial de  $O_2$  e a excreção nitrogenada e aumentam a perda iônica difusiva.

O  $Ca^{2+}$  tem um papel fundamental na manutenção da homeostasia e diminuição do estresse associado a esses fatores, pois interfere na permeabilidade das membranas e integridade das junções celulares, na viscosidade do muco e na regulação das bombas de prótons (ionoregulação).

O entendimento das relações ecológicas e das adaptações que podem ocorrer no ambiente natural e de cultivo são extremamente importantes para o maior conhecimento do jundiá, tendo em vista que essa espécie apresenta excelentes características zootécnicas, como rusticidade, docilidade, facilidade na indução da reprodução além da boa qualidade da carne, o que atrai cada vez mais os piscicultores, especialmente para cultivos em regiões nas quais é endêmico. É uma espécie bastante aceita no mercado consumidor tanto para pesca esportiva quanto para alimentação, sendo a sua produção apropriada em regiões de clima temperado e subtropical, como o sul do Brasil.

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas ao cultivo do jundiá aumentaram bastante, tornando-a uma das espécies brasileiras mais conhecidas. Entretanto,

muitos aspectos do seu cultivo ainda são pouco conhecidos e muitos fatores devem ser superados para efetivar o seu grande potencial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis, EDUFSC, 231p. 2004.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria. EDUFMS. 2002.
- BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia* sp). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. EDUFMS, Santa Maria, 232p. 2005.
- BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M.; SALOMÃO, L.C. Effect of pH on ion and water transport in the gut of freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. **Ciência e Cultura**, 45: 396–398. 1993.
- BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M. Ion and water transport in the gut on the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. **Ciência e Cultura**, 47: 83–85. 1995.
- BALDISSEROTTO, B.; KAMUNDE, C.; MATSUO, A.Y.O.; WOOD, C.M. Acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout is reduced by dietary calcium carbonate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, C137: 363–372. 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C (org). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, EDUFMS. 468p. 2005.
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura de água doce no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e propostas para o futuro. Whorkshop Ictiologia no RS, Porto Alegre, novembro 2006, 17p.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after harvest acute stress. **Aquaculture Research**, v.34, n.14, p.1465-1469. 2003.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Nursery rearing of jundia, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking, density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v.232, n.1/4, p. 383-394. 2004.
- BIJVELDS, M.J.C., VAN DER VELDEN, J.A.; KOLAR, Z.; FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. **Journal of Experimental Biology**, 201: 1981–1990. 1998.
- BOGÈ, G.; LOPES, L.; PÉRÈS, G. An *in vivo* study of the role of pyloric caeca in water absorption in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 91: 9–13. 1988.
- BOCKMANN, F.A.; GUAZZELLI, G.M. Family Heptaperidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, Jr., C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPUCRS, p.406-431. 2003.

BOYD, C. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Auburn Univ. Press, Birmingham. 1990.

BRAUN, N.; LIMA, R.L.; MORAES, B.; LORO, V.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, 37, 1524-1531. 2006.

BRETT, J. R.; BLACKBURN, J. M. Oxygen requirements for growth of young coho (*Oncorhynchus kisutch*) and sockeye (*O. nerka*) salmon at 15°C. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 38, 399–404. 1981.

BUDDIGTON, R.K.; CHEN, J.W.; DIAMOND, J. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. **Journal of Physiology**, 393: 261–281. 1987.

CARDOSO, A.P.; Radunz Neto, J.; Medeiros, T.S.; Knöpker, M.A.; Lazzari, R. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolizados. **Acta Scientiarum**, v.26, p. 457-462. 2004

CHIPPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperature for *Rhamdia quelen* fingerlings (Pimelodiade). **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, n.4, p.11-21. 1999.

CHIPPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish, *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.1069-1071. 2000.

COLDEBELLA, I. & RADUNZ NETO, J. Farelo de Soja na alimentação de alevinos de jundiá. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 499 – 503, 2002.

DABROWSKI, K.; LERAY, C.; NONNOTTE, G.; COLIN, D.A. Protein digestion and ion concentration in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) digestive tract in sea and freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, A83: 27–39. 1986.

FLIK, G.; VAN DER VELDEN, J.A.; DECHERING, K.J.; VERBOST, J.M.; SCHOENMAKERS, J.M.T.H.; KOLAR, Z.I.; WENDELAAR BONGA, S.E. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: A review. **Journal of Experimental Zoology** 265: 356–366. 1993a.

FLIK, G.; AT SMA, W.; FENWICK, J.C.; RENTIER-DELRUE, F.; SMAL, J.; WENDELAAR BONGA, S.E.. Homologous recombinant growth hormone and calcium metabolism in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, adapted to fresh water. **Journal of Experimental Biology**, 185: 107–119. 1993b.

FLIK, G.; VERBOST, P.M. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, pp. 251–263. 1995.

FLIK, G.; KLAREN, P.H.M.; SCHOENMAKERS, T.J.M.; BIJVELDS, M.J.C.; VERBOST, P.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Cellular calcium transport in fish: Unique and universal mechanisms. **Physiological Zoology**, 69: 403–417. 1996.

FOSS, A.; SIIKAVUOPIO, S.I.; SÆTHERS, B.S.; EVENSEN, T.H. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. **Aquaculture**, 237: 179-189. 2004.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.I; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Effect to salt in the water for transport on survival and on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels of silver catfish, *Rhamdia quelen* fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, n. 4, p. 1-9. 1999.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.I; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundia *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.1, p. 179-185. 2000.

GONZALES, R.J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. In: VAL, A.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. **Physiology and Biochemistry of Fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto de Pesquisas da Amazônia, 420p. 1996.

GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 1980.

HANDY, R.D.; POXTON, M.G. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 3, 205-280. 1993.

IBAMA. Estatística da pesca 2000. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 16p. 2000.

IBAMA. Estatística da pesca 2001. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 124p. 2001.

IBAMA. Estatística da pesca 2002. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 129p. 2002.

IBAMA. Estatística da pesca 2003. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 137p. 2003.

IBAMA. Estatística da pesca 2004. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 136p. 2004.

IBAMA. 2007. Estatística da pesca 2005. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 108p.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman & Hall. 1994.



KERSTETTER, T.H.; WHITE, R.J. Changes in intestinal water absorption in coho salmon during short-term seawater adaptation: A developmental study. **Aquaculture**, 121: 171–180. 1994.

MAGAUD, H.; MIGEON, B.; MORFIN, P.; GARRIC, J. & VINVIMIAN, E. Modelling fish mortality due to urban storm run-off: interacting effects of hypoxia and un-ionized ammonia. **Water Resources**, 31, n. 2, p. 211-218, 1997.

MARCHIORO, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824. Pisces, Pimelodidae) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v. 29, n2, p. 315 – 318, 1999.

MIRON, D.S.; SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, J.I; BALDISSEROTTO, B. Efficacy of Different Salt (NaCl) Concentration in the Treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* – Infected Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 14 (1/2), p. 155-161, 2003.

MIRON, D.S. Efeito da amônia em diferentes níveis de pH da água na sobrevivência e no crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). 2004. 41f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria. 2004

MIRON, D.S.; MORAES, B.; BECKER, A.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R.; LORO, V.L.; BALDISSEROTTO, B. 2007. Interactions between water ammonia and pH on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture** (in press)

PARRA, J.G.; BALDISSEROTTO, B. Effect of water hardness on survival and growth of freshwater teleost. In: Baldisserotto, B.; Mancera, J.M.; Kapoor, B.G. **Fish Osmoregulation**. Eds. Enfield, USA: Science Publisher. 2007.

PEDERSEN, C. L. Energy budgets for juvenile rainbow trout at various oxygen concentrations. **Aquaculture**, 62, 289–298. 1987.

PERSON-LE-RUYET, J.; GALLAND, R.; LE ROUX, A.; CHARTOIS, I. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, 154, 155-171. 1997.

PIAIA, R.; RADUNZ NETO, J. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas de jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.27, n. 2, p.319-323. 1997a

PIAIA, R.; RADUNZ NETO, J. Efeito de níveis crescentes de levedura de álcool em rações contendo fígado bovino, sobre a performance de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.27, n. 2, p.313-317. 1997b.

PICHAVANT, K.; PERSON-LE-RUYET, J.; LE BAYON, N.; SEVERE, A.; LE ROUX, A.; BOEUF, G. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. **Journal of Fish Biology**, 59, 875–883. 2001

RODGERS, D.W. Ambiente pH and calcium concentrations as modifiers of growth and calcium dynamics of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science**, 41: 1774-1780. 1984.

RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Toxicity of ammonia nitrite and nitrate to fishes. Aquaculture and water quality. In: Brune, E., Tomasso, J.R. (eds), **Advances in World Aquaculture**, vol. 3. WAS, pp. 58-89. 1991.

SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, B. & BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, 228, 279 – 287, 2003.

SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, J.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentration. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.2, p.299-304. 2005.

STIFFLER, D.F.; GRAHAM, J.B.; DICKSON, K.A.; STOCKMANN, W. Cutaneous ion transport in the freshwater teleost *Synbranchus marmoratus*. **Physiological Zoology** 59: 406–418. 1986.

TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. **Reviews in Fisheries Science**, v. 2, n.4, p. 291-314. 1994.

TOMASSO, J.R.; CHERVI, A.; GOUDIE, Bill; SIMCO, A.; DAVIS, K.B. Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 109, p. 229 – 234. 1980.

TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**, v.9, p.413-419. 2001.

TOWNSEND, C.R.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different level of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p. 103-108. 2003.

ULIANA, O. Influência de diferentes fontes e níveis de lipídios sobre a criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodiade. Santa Maria-RS. 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. 1997.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; DIAMANT, A.; POPPER, D.M. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. **Journal of Fish Biology**, 42: 321-328. 1993.

WALSH, P.J.; VEAUUVY, C.M.; MC DONALD, M.D.; PAMETER, M.E.; BUCK, L.T.; WILKIE, M.P. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 147, p.332-343. 2007.

WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.W.; Benson, W.H. (Eds). **Traget Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**, vol. 1, Organs, Taylor and Francis, Washington, DC. Pp. 1-89. 2001.

WURTS, W.A.; DURBOROW, R.M. Interaction of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. **Aquaculture Program SRAC publication**, 464 ed. 6p. 1992

ZAIONS, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1041-1045. 2000.

ZANIBONI FILHO, E. Valorização das espécies nativas. Esforços para o desenvolvimento de pacote tecnológico. In: XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. 2002. Goiania. **Anais...** Associação Brasileira de Aquicultura; ed. Elisabeth Urbinati & Jose Eurico Possebon Cyrino. 2002.