



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
 Coordenação de Capacitação  
 Divisão Apoio Técnico

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA  
 RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DA FAUNA PARASITÁRIA INTESTINAL DO TAMBAQUI  
 (*Colossoma macropomum*) CRIADOS EM SISTEMA DE TECNOLOGIA DE  
 BIOFLOCOS (BFT)**

**BOLSISTA:** Luis Felipe Serra Moreira

**ORIENTADOR(A):** Dra. Elizabeth Gusmão

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
 CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
 INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

Manaus – Amazonas  
2017

**Título Trabalho do Bolsista:** Avaliação da fauna parasitária intestinal do tambaqui (*Colossoma macropomum*) criados em sistema de tecnologia de bioflocos (BFT)

**Resumo (250 a 400 palavras)**

Com a estagnação da pesca nos últimos anos e a produção insuficiente para suprir a demanda da população por alimentos de origem animal, o uso de novas tecnologias sustentáveis, que tem como objetivo intensificar a produção, têm sido necessárias. O sistema de tecnologia de bioflocos (BFT) vem sendo, cada vez mais, utilizado, por ser um sistema que melhora a produção e reduz os prejuízos ao meio ambiente. O objetivo do trabalho foi avaliar a sanidade dos peixes criados em sistema de tecnologia de bioflocos e sistema de água clara, nas densidades de 50, 100 e 200 peixes/m<sup>3</sup>, por meio de análises parasitológicas macroscópica do trato gastrointestinal dos animais. Foram coletados um total de 90 peixes, sendo 5 por tratamento ou por UE, no início e no final do experimento. Foi determinado as variáveis físico-químicas da água: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total e nitrito no decorrer do cultivo. Os resultados das análises parasitológicas e de qualidade de água foram comparados entre os tratamentos, utilizando análise de variância ANOVA a 95% de significância ( $p > 0,05$ ). Não foram encontrados nenhum parasito intestinal nos peixes avaliados, mostrando que, tanto o sistema de tecnologia de bioflocos, quanto o sistema de água clara, nas condições laboratoriais avaliadas, evitou a contaminação de parasitas nos peixes por fatores externos, por se tratarem de sistemas fechados. Também foi possível observar que, apesar de apresentarem uma diferença significativa entre OD, amônia total e nitrito entre tratamentos, a qualidade da água se manteve dentro dos valores recomendados para a espécie, evitando, assim, estresse e suas consequências indesejáveis.

**Palavras Chave:** Bioflocos, *Colossoma macropomum*, parasitos, sistema de cultivo.

**Subárea:** Multidisciplinar

**Financiamento**

PIBIC/CNPq

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

---

Data: 30/12/17

  
Elizabeth Gusmão Affonso  
Pesquisadora COTI/INPA

---

Orientador(a)

  
Luis Felipe Sero

---

Bolsista

---

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o aumento da demanda por pescado e a estagnação da pesca extrativa, a aquicultura tornou-se excelente alternativa para suprir a crescente demanda mundial por alimentos (FAO, 2016). Contudo, sua produção ainda é insuficiente para atender a necessidade do mercado, sendo necessárias novas tecnologias sustentáveis que possam intensificar a criação. Isso porque a aquicultura vem sofrendo com fatores limitantes para sua produção, como, por exemplo, a grande quantidade de água utilizada e o espaço necessário para infraestrutura de criação. Porém, já existem sistemas que permitem uma atividade sustentável, com respeito as questões sociais, ambientais e econômicas (Oliveira, 2009).

Dentre estes, a tecnologia de bioflocos (BFT), um sistema cada vez mais utilizado, para otimizar a produção, além de reduzir os prejuízos ambientais. Esse sistema é caracterizado pela não renovação de água, e estimula a formação de uma biota, predominantemente aeróbica e heterotrófica, a partir da fertilização com fontes ricas em carbono orgânico, além da aeração constante e intensa do ambiente de cultivo (Hargreaves, 2013). Possui diversas vantagens, como, por exemplo, redução no uso da água, menor risco de disseminação de doenças, possibilita o uso de dietas com menor teor de proteína, o que pode diminuir a quantidade de ração utilizada, além do efeito probiótico causado por microrganismos presentes no sistema (Wang *et al.* 2015). Entretanto, com a intensificação da criação, onde há um maior adensamento dos animais, pode facilitar o aparecimento de doenças, causadas por uma diversidade de patógenos (Pavanelli *et al.*, 2008; Tavares-Dias *et al.* 2013).

Atualmente, o sistema BFT vem sendo utilizado para diversas criações de peixes e camarões com sucesso, e resultados experimentais promissores já foram verificados para o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Santos *et al.* 2015; Fugimura 2013). Essa é a segunda espécie mais produzida na aquicultura brasileira e primeira entre as nativas, sendo a região Norte a maior produtora. Em 2013, a produção de tambaqui foi de 105 mil toneladas, perdendo apenas para a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (IBGE, 2015). Isso é possível devido sua capacidade de tolerar altas densidades de estocagem, boa adaptação ao confinamento, eficiência na conversão alimentar e excelente valor de mercado (Fernandes *et al.*, 2010), sendo, portanto, características ideais para criação em sistema BFT.

As doenças de organismos aquáticos têm sido um fator de constrangimento para o desenvolvimento da aquicultura, e tem afetado espécies de importância comercial no mundo todo,

como por exemplo, protozoários como os *Ichthyophthirius multifiliis*, que causam a “doença dos pontos brancos”, responsável por prejuízos em todo o mundo, além de acantocéfalo, nematoda e outros parasitos que infectam os animais (Luque, 2004). Esses parasitos também têm afetado a economia do Brasil e causado infecções, tanto em animais de criação quanto em peixes selvagens, como por exemplo, larvas de acantocéfalos e nematoides encontradas em tambaquis (*Colossoma macropomum*) em diferentes regiões do Amazonas e Rondônia (Malta *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2015; Jérônimo *et al.*, 2017), e no pirarucu (*Arapaima gigas*), no estado do Amapá e Amazônia Ocidental (Marinho *et al.*, 2013). A infestação por nematoides pode afetar a fisiologia e o comportamento dos peixes e retardar o crescimento (Pavanelli *et al.* 2013). A infestação por acantocéfalos tem sido a grande preocupação dos produtores de tambaqui na região Norte, devido elevadas perdas na produção. Esses parasitos causam lesões severas na parede intestinal, ao se fixar no intestino, absorvendo nutrientes e, conseqüentemente, diminuição no ganho de peso e na sobrevivência dos peixes (Sandoval Jr *et al.* 2013).

O acompanhamento dos animais, durante a recria, em sistemas de cultivo é relevante, permitindo, assim, tomar medidas preventivas e ou profiláticas, caso haja infestação por patógenos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a sanidade dos peixes, por meio da fauna de endoparasitos do tambaqui, criados em sistema de bioflocos, sob diferentes densidades de estocagem. Adicionalmente, os parâmetros físico-químicos da água foram avaliados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de tambaqui, com aproximadamente 1,0 g, foram adquiridos de uma piscicultura comercial, localizada no município de Rio Preto da Eva, AM e mantidos em um viveiro berçário de 50 m<sup>2</sup> na Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisa em Tecnologia e Inovação (COTI) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Previamente, o berçário foi esterilizado, utilizando o processo de calagem que consiste em aplicar cal virgem nas paredes e no fundo do tanque, eliminando ovos, larvas e outros seres vivos, como crustáceos, que podem servir como hospedeiros intermediários de alguns parasitos. Isso evita a contaminação nos peixes, uma vez que torna o ambiente livre de parasitos.

Para a realização do experimento, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3 x 3, constituído por três sistemas de cultivo: basal (controle), bioflocos e

água clara (sem produtividade natural), com três densidades de estocagem (50, 100 e 200 alevinos/m<sup>3</sup>), distribuídos em 21 unidades experimentais. Os peixes, com peso médio inicial de 23 g, foram alimentados quatro vezes ao dia (7:30, 10:30, 13:30 e 16:30 h), com base na biomassa de cada unidade experimental (5% da biomassa). As análises parasitológicas foram realizadas antes do início do experimento, tempo 0 (= T1), e concluídas após 60 dias de tratamento, tempo 1 (T2). Para isso, 30 peixes, de cada tratamento, foram eutanasiados, conforme o protocolo da AVMA (2013). Suas estruturas internas (trato gastrointestinal) foram retiradas com o auxílio de tesouras, bisturis e pinças, colocados em placas de Petri e observados sob estereomicroscópio da Zeiss®.

O monitoramento da qualidade de água foi acompanhado durante o experimento, com a determinação das seguintes variáveis físico-químicas:

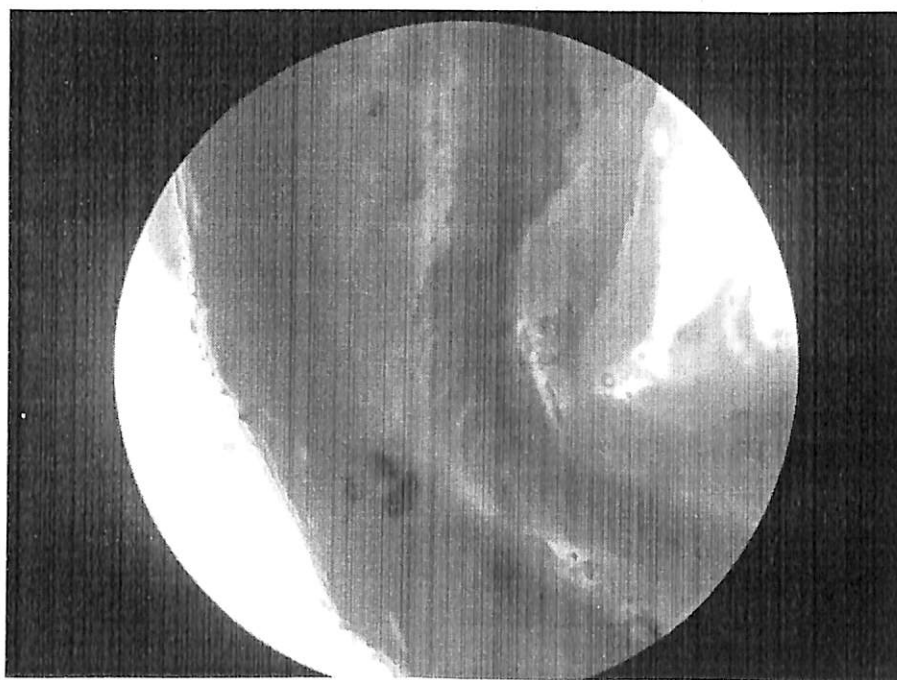
- Oxigênio dissolvido (OD), temperatura e condutividade elétrica - com o auxílio de um oxímetro digital da YSI, modelo 85/10;
- pH- com pHmetro digital da YSI, modelo 60/10.
- Concentração de amônia total (NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) está sendo realizada pelo método de Verdouw *et al.* (1978) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) segundo Boyd e Tucker (1992) e as absorbâncias lidas num espectrofotômetro UV/Visível (BIOPLUS 2000);
- Gás carbônico (CO<sub>2</sub>) - segundo Boyd e Tucker (1992) modificado, utilizando seringas de 10 ml para evitar o contato das amostras de água com o ar.

Todas as análises foram comparadas pelo teste estatístico ANOVA, em nível de significância de 95% ( $\alpha= 0,05$ ) (Zar, 1999), seguido pelo teste de Tukey, quando as diferenças foram significativas a 5% de probabilidade, utilizando o programa Statsoft Statistica 7.0®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 120 tambaquis provenientes de dois tratamentos T1 (30 do BFT e 30 do AC) e T2 (30 do BFT e 30 do AC), foram analisados. Durante as análises, não houve registro de nenhuma espécie parasitária. A ausência de parasitos no trato gastrointestinal dos peixes, pode estar relacionado às características do ambiente no qual foram realizados os tratamentos (BFT e AC), em condições laboratoriais, num ambiente fechado e controlado, impossibilitando qualquer veículo de contaminação, seja pela água ou por hospedeiros intermediários. Além disso, os animais estavam isentos de parasitos no início dos experimentos, conforme foi comprovado pelas análises iniciais.

Os nematoides e os acantocéfalos são endoparasitas que infectam os peixes pela água contaminada com as larvas e vetores (hospedeiros intermediários), como crustáceos e outros peixes. Os ciclos de vida desses parasitos, inicia no estágio de ovos, que eclodem na água, dando origem as larvas, que infectam um hospedeiro intermediário, como crustáceos que serão ingeridos pelos peixes, os hospedeiros definitivos. Os nematoides, podem ainda, contaminar os hospedeiros definitivos (peixes) diretamente através das larvas, dispensando assim, o hospedeiro intermediário (Noga, 2010). De uma forma em geral, os surtos epizoóticos por parasitismo em peixes, ocorrem nos sistemas de cultivo, quando as condições são propícias, com manejo da qualidade da água do ambiente e alimentar inadequados (Thatcher; Neto, 1994). Nessas condições, os animais podem ficar imunodeprimidos, favorecendo o desenvolvimento de doenças (Tavares-Dias, 2009). No presente estudo, as condições do ambiente aquático e o manejo alimentar dos juvenis de tambaqui, atenderam as necessidades da espécie, proporcionando o equilíbrio do ambiente e as boas condições sanitárias dos animais.



**Figura 1:** Trato gastrointestinal de tambaqui sem presença de parasitos.

Alterações nas variáveis físico-químicas da água, podem causar estresse nos animais, e com isso, induzir os animais a imunodepressão, deixando-os suscetíveis à doenças, proliferação de parasitos e podendo causar mortalidade nos animais (Bonga, 1997). Assim, torna-se imprescindível o

acompanhamento dessas variáveis nos sistemas de cultivo. Na tabela 1, estão representadas as variáveis físico-químicas da água dos tratamentos.

As médias do oxigênio dissolvido (OD) nos dois períodos avaliados, apesar de não ter apresentado diferença estatística, aumentou conforme diminuiu a densidade de estocagem que variou de  $5,07 \pm 0,02$  a  $6,21 \pm 0,17$  no período da manhã e  $4,61 \pm 0,02$  a  $5,57 \pm 0,17$  mg.L<sup>-1</sup>.

Tabela 1. Média do oxigênio diluído (OD), pH e temperatura no período matutino e vespertino no sistema de tecnologia de bioflocos (BFT) e água clara (AC) nos diferentes níveis de densidade.

Variáveis	Densidade	BFT	AC
OD (mg/L; manhã)	200	$5,07 \pm 0,02^*$	$5,76 \pm 0,07^*$
	100	$5,72 \pm 0,38^{**}$	$6,24 \pm 0,24^{**}$
	50	$6,21 \pm 0,17^{***}$	$6,71 \pm 0,20^{***}$
OD (mg/L; tarde)	200	$4,61 \pm 0,02^*$	$4,86 \pm 0,07^*$
	100	$4,95 \pm 0,38^{**}$	$6,24 \pm 0,24^{**}$
	50	$5,57 \pm 0,17^{***}$	$6,71 \pm 0,20^{***}$
Amônia total (mg/L NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> )	200	$1,88 \pm 0,55^*$	$2,92 \pm 1,19^*$
	100	$1,33 \pm 0,81^{**}$	$2,46 \pm 1,02^{**}$
	50	$1,07 \pm 0,13^{***}$	$1,70 \pm 0,15^{***}$
Nitrito (mg/L NO <sub>2</sub> )	200	$1,95 \pm 0,20^*$	$2,25 \pm 0,09^*$
	100	$1,29 \pm 0,10^{**}$	$1,59 \pm 0,06^{**}$
	50	$1,12 \pm 0,13^{***}$	$1,33 \pm 0,13^{***}$
pH (manhã)	200	$7,37 \pm 0,12$	$7,49 \pm 0,01$
	100	$7,50 \pm 0,07$	$7,51 \pm 0,10$
	50	$7,56 \pm 0,17$	$7,51 \pm 0,14$
pH (tarde)	200	$7,21 \pm 0,14$	$7,32 \pm 0,12$
	100	$7,38 \pm 0,48$	$7,35 \pm 0,16$
	50	$7,44 \pm 0,23$	$7,44 \pm 0,35$
Temperatura (°C manhã)	200	$26,02 \pm 0,13$	$25,93 \pm 0,06$
	100	$26,05 \pm 0,12$	$25,95 \pm 0,04$
	50	$26,04 \pm 0,12$	$26,07 \pm 0,03$
Temperatura (°C tarde)	200	$27,03 \pm 0,08$	$27,03 \pm 0,16$
	100	$26,86 \pm 0,35$	$27,10 \pm 0,03$
	50	$27,07 \pm 0,11$	$27,25 \pm 0,05$

(\*) representam diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) pelo teste de ANOVA



Houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o OD, o nitrito e a amônia do bioflocos e da água clara, onde foi possível observar que o sistema de AC apresentou uma média maior destes valores. O sistema de tecnologia de bioflocos é um sistema intensivo e tem um consumo maior de oxigênio, foi possível observar também um aumento do OD proporcional à diminuição da biomassa, tanto no BFT quanto no AC, pois com uma menor biomassa, o consumo de oxigênio é menor, porém, a amônia e o nitrito tiveram um aumento proporcional a densidade, quanto maior o número de animais, maior é o consumo de ração e a excreção dos peixes. Não houve diferença significativa nos valores de temperatura e pH entre os tratamentos e as diferentes densidades, pois, a aeração e a alimentação eram as mesmas. Ambos os sistemas foram submetidos a uma aeração intensa e contínua.

No cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos com diferentes densidades de estocagem, estudado por Lima *et al.* 2015, foi possível comparar que os valores de OD também aumentaram de modo inversamente proporcional em relação a biomassa no BFT, o pH e a temperatura também não sofreram diferença significativa entre as diferentes densidades, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Apesar das diferenças observadas entre as variáveis, os dois sistemas (de bioflocos e de de água clara), apresentaram valores dentro do recomendado para a espécie (Aride *et al.* (2007; Cavero *et al.* 2009).

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo, é possível observar que o sistema de tecnologia de bioflocos em condições laboratoriais, evita a contaminação dos animais por fatores externos e mantém a qualidade da água dentro do recomendado.

## REFERÊNCIAS

Andrade-Porto, S.M.; Cárdenas, M.Q.; Martins, M.L.; Oliveira, J.K.Q.; Pereira, J.N.; Araújo, C.S.O.; Malta, J.C.O. 2015. First Record of Larvae of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) With Zoonotic Potential in the Pirarucu *Arapaima Gigas* (Osteichthyes: Arapaimidae) From South America. *Instituto Internacional de Ecologia*, 4: 790.

Aride, P. H. R.; Roubach, R.; Val, A. L. 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38: 588-594.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



AVMA. 2013. (<https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>). Acesso em 15/06/2017.

Bonga, W. S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, n.3, p591-625.

Boyd, C.; Tucker, C. 1992. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Alabama, Auburn University, 183p.

Cavero, B. A. S.; Rubim, M. A. L.; Pereira, T. M. 2009. Criação comercial do tambaqui *Colossomacropomum* (Cuvier, 1818) In: Tavares-Dias, M. (Org.). *75 Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: EMBRAPA Amapá, p. 33- 46.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.

Fernandes, T. R. C; Doria, C. R. C; Menezes, J. T. B. 2010. Características de carcaça e parâmetros de desempenho do Tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) em diferentes tempos de Cultivo e alimentado com rações comerciais. *Acta Amazonica*, 1: 45-52.

Fugimura, M. M. S. 2013. *Avaliação da criação intensiva do camarão branco *Litopenaeus schmitti* com a tecnologia de bioflocos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Zootecnia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 91p.

González, I. D. 2006. *Anisakis em el pescado: prevención y control*. (<http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion>) Acesso em: 26/01/2017

Hargreaves, J.A. 2013. Biofloc Production System for Aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center (SRAC)*, 4503.

IBGE,2015. Sidra, (<http://www.sidra.ibge.gov.br>). Acesso em 27/01/2017

Jerônimo, G.T.; Pádua, S.B.; Belo, M.A.A.; Chagas, E.C.; Taboga, S.R.; Maciel, P.O.; Martins, M.L. 2017. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. *Aquaculture*, no prelo.

Luque J.L. 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 13(1):161-165.

Malta, J.C.O.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S.; Varella, A.M.B. 2001. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae*. Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 31(1): 133-143.

Noga, E.J. 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, 2nd ed. Willey-Blackwell, Ames, Iowa, 536p.

Oliveira, R.C. 2009. O panorama da aquicultura no Brasil: prática com foco na sustentabilidade. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 1: 71-89.

Oliveira, S. R. K. S.; Bezerra, M. V. P.; Belo, M. A. A. 2015. Estudo da endofauna parasitária do tambaqui, colossoma macropomum, em pisciculturas do vale do jamari, estado de Rondônia. *Enciclopédia Biosfera*, 11: 1026-1041.

Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2008. *Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Eduem, Maringá. 311 pp.

Pavanelli, G. C.; Takemoto, R. M.; Eiras, J. C. 2013. *Parasitologia: peixes de água doce do Brasil*. Ed. Universidade Estadual de Maringá- EDUEM, Maringá, 452p.

Sandoval Jr, P.; Trombeta, T. D. & Mattos, B. O. 2013. *Manual de criação de peixes em taques-rede*. EMBRAPA, Brasília.

Santos, R. B.; Affonso, E. G.; Fugimura, M. S. M. 2015. *Uso da tecnologia de bioflocos na recria de tambaqui Colossoma macropomum (Cuiver, 1818) sob diferentes densidades de estocagem*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas. 33p.

Tavares-Dias, M. 2009. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa, Amapá, 723p.

Tavares-Dias, M.; Araujo, C. S; Porto. S. M; Viana, G. M; Monteiro, P. C. 2013. *Sanidade do Tambaqui Colossoma macropomum nas fases de Larvicultura e Alevinagem*. Embrapa, São Paulo, 42p.

Thatcher, V. E.; Neto, B. J. 1994. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.16, n3, p111-128.

Verdouw, H.; Van Echteld, C. J. A.; Dekkers, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 6: 399-402.

Wang, G.; Yu E.; Xie, J.; Yu, D.; Li, Z.; Luo, W.; Qiu, L., Zheng, Z. 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 443: 98-104.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1999, 471p.