

Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Oceanografia  
Programa de Pós Graduação em Aquicultura

RENATO ADRIANO DOS SANTOS

JUVENIS DE BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum* CRIADOS EM SALINIDADE  
REDUZIDA: A ADIÇÃO DE NaCl NA DIETA PODE AFETAR O DESEMPENHO DO  
CRESCIMENTO E A OSMORREGULAÇÃO?

FURG  
RIO GRANDE, RS  
2011

Oc. RENATO ADRIANO DOS SANTOS

Juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* criados em salinidade reduzida: a adição de NaCl na dieta pode afetar o desempenho do crescimento e a osmorregulação?

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Dr. Marcelo B. Tesser

Co-orientador: Dr. Luís A. Sampaio

Rio Grande, RS, Brasil

Fevereiro de 2011

## **Folha de aprovação**

*Dedico este trabalho às mulheres da minha vida! À primeira mulher que enxergou a minha beleza, minha mãe, Eliana. E à mais recente, Camila.*

## Agradecimentos

Cheguei à conclusão que essa é parte mais irônica do trabalho. Quem quer ler a dissertação passa batido por aqui, e quem quer ler isso, passa batido pelo título. Vai entender!?! Ainda nesses dias de minha escrita, por achar que o sistema de meu laptop estava lento, fiz uma limpeza nos arquivos para aliviar a memória e quem sabe abrir com mais agilidade o meu editor de textos. Não deu certo – e antes que esqueça, obrigado, Murphy! Mas, encontrei uma dissertação de um grande amigo. Moramos juntos, aliás. Incrível como ele foi original neste ítem do documento. Não nomeou um fulano ou sicrano para não provocar constrangimentos à pessoa que o acompanhou durante aqueles anos.

Neste momento de “dissertar” é absolutamente passível e compreensível o esquecimento da citação. Até a ordem da colocação nominal pode despertar a pergunta, por quê ele primeiro?. Realmente, o Jonatas tinha razão. As pessoas (inclusive eu!) ao pegar uma dissertação, agem como fosse um listão do vestibular.

Mas, creio que não se deve levar ao pé da risca, meu caro amigo, e alguns atos merecem o agradecimento. Atos em prol da construção deste são dignos de uma citação. Neste caso, para não cair no esquecimento, pode-se perfeitamente generalizar através de um termo que todos se identifiquem, e assim, se sintam inseridos naquele trabalho, *e.g.* Cataia. Todos meus amigos que me auxiliaram em Ilha Comprida saberão que os homenageio com os mais sinceros votos.

E por aí eu deslancharei e generalizarei. Inicio pelos profissionais: FURG, PPGAq e CNPq; Lanam, Instituto de Pesca (Cananéia/SP), Fisiologia (valeu Jorjão!), LTA e Parasito; e por último, não em importância, aos membros da banca. Aos amigos seguem as dicas: Grecco Dalmolin dos Santos, Macacos e Pinguins; EMA, SAC, Cassinão Cassinão. E aos momentos marcados por: Águas (mineral e de coco), Cafés e Sucos; Serramalte, Polar, Patricia, Zillertal, Quilmes e Stella Artois; Cabernet’s, Jim Bean, Velho, Walkers, Cazadores, Saquê, Cataia e Campari; costela fogo de chão, peixes assado, cru, frito e cozido, yakisobah, frango agridoce, massa, feijão tropeiro, queijos, churras e churras, churipão, pão com manteiga, media lunas, parrilla, entrecot; na leão, pansera, tartufo, galetto caxias, doze e noventa, shangay, sushibah, ângela e larus. E tantos outros momentos Compartilhados ao longo desses dois anos.

A todos, o meu sincero muito obrigado pela oportunidade do aprendizado.

## Resumo

Organismos marinhos em salinidades reduzidas encontram um desafio fisiológico diferente daquele naturalmente encontrado em salinidade oceânica. Isso ocorre porque esses se tornam hiper-osmóticos em relação ao meio. A literatura sugere que a adição de sal na dieta pode suprir a perda passiva de íons e, conseqüentemente, melhorar o crescimento. Dessa forma, os efeitos da suplementação de sal na dieta (SD) no crescimento, na sobrevivência, na osmorregulação e nas alterações histológicas branquiais foram avaliados em juvenis de bijupirá (12 g) criados em salinidade 5. O bijupirá, *Rachycentron canadum*, tem recebido a atenção de pesquisadores e investidores no mundo inteiro devido às suas características positivas que a elegem uma espécie com potencial na piscicultura marinha. Durante 40 dias, os peixes foram alimentados, diariamente em dois turnos, com dietas contendo diferentes níveis de NaCl: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% do peso seco da dieta basal (todos em triplicata). Ao final do experimento os arcos branquiais foram coletados para avaliação histológica e determinação da atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. A sobrevivência foi 100% em todos os grupos e não houve diferença no peso médio final entre os tratamentos. Entretanto, 7,5 e 10% de NaCl resultaram em piores taxas de conversão alimentar e maior consumo alimentar comparadas aos demais grupos. A atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase branquial foi estatisticamente reduzida quando os peixes receberam dietas com níveis de 2,5; 5 e 7,5% de NaCl em relação ao grupo 0,0%. O número de células de cloreto do grupo controle (16 células  $\text{mm}^{-2}$ ) diferiu significativamente dos grupos SD. Foi verificado o aumento da proliferação celular de acordo com o aumento do sal na dieta, atingindo 41 células  $\text{mm}^{-2}$  nas brânquias dos peixes do grupo 10% de NaCl. Esses dados sugerem que a suplementação de NaCl não é necessária para o crescimento em salinidade 5, apesar do bijupirá apresentar menor atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase nos grupos com baixa adição de NaCl na dieta.

Palavras-chave: Beijupirá; peixe marinho; água salobra;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ /ATPase; célula de cloreto.

## Abstract

Marine fish in low-saline water encounter the physiological challenge of passive loss of ions and water gain. Some studies suggested that dietary salt can provide physiological necessities and may, consequently, improve growth. *Cobia *Rachycentron canadum** is a fast growing fish and its commercial interest has been increasing around the world. The aim of this study was to investigate the influence of salty diet (SD) on growth performance, gill histological alterations, and osmoregulation of cobia reared in low salinity. Cobia juveniles (12 g) were acclimated to salinity 5 and fed with five dietary NaCl levels: 0.0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10.0% dry weight of a basal diet (all with three replicates). Fishes were fed twice daily until satiation for 40 days. At the end of experiment, gill arches were sampled for histological evaluation and for determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. Survival after 40 days was 100% in all treatments. The results showed that NaCl supplementation did not improve growth performance and the highest levels of SD (7.5 and 10%) showed unfavorable effects on food conversion and feed intake. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in fishes fed with the basal diet was significantly higher than in those fed with 2.5%, 5.0 and 7.0% NaCl supplementation. The number of chloride cells significantly increased with increasing dietary salt level, reaching 2.5 fold higher in 10% NaCl supplementation (41 cells mm<sup>-2</sup>) when compared to group 0.0% (16 cells mm<sup>-2</sup>). Summarily, dietary salt supplemented has consequences on chloride cells proliferation, but, apparently, cobia seems to spare energy, since it reduced the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity.

Keywords: Bijupirá; marine fish; brackish water; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/ATPase; chloride cell.

## Sumário

1. Introdução Geral.....	1
1.1 Conhecendo o bijupirá.....	1
1.1.1 Descrição da espécie.....	1
1.1.2 Importância econômica .....	2
1.1.3 Distribuição .....	2
1.1.4 A criação de <i>R. canadum</i> .....	4
1.1.5 Efeitos da qualidade da água em <i>R. canadum</i> .....	5
1.1.6 Alimentação e nutrição do bijupirá.....	8
1.2 A criação de teleósteos marinhos em baixa salinidade.....	10
1.3 Adição de sal na dieta .....	13
2. Objetivos .....	16
2.1 – Geral.....	16
2.2 – Específicos.....	16
Referências Bibliográficas .....	17
APÊNDICE A – Artigo científico da presente dissertação de mestrado. ....	24
Juvenile cobia <i>Rachycentron canadum</i> reared at brackish water: May the addition of sodium chloride in diet improve growth and osmoregulation parameters?.....	25
<b>Abstract</b> .....	26
<b>1. Introduction</b> .....	26
<b>2. Material and methods</b> .....	27
2.1 Acclimation .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2 Experimental design and diets .....	28
2.3 Gill Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase activity .....	28
2.4 Chemical analysis .....	29
2.5 Histological procedures .....	29
2.6 Growth and feed parameters .....	30
2.7 Statistical analyses .....	30
<b>3. Results</b> .....	30
<b>4. Discussion</b> .....	31
<b>Acknowledgements</b> .....	34
<b>References</b> .....	35
Conclusões .....	49



## 1 **1 Introdução Geral**

2

3

### 4 *1.1 Conhecendo o bijupirá*

5

6

#### 7 1.1.1 Descrição da espécie

8

9

10 *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766), originalmente descrito como *Gastorosteus*  
11 *canadus*, é a única espécie existente da família Rachycentridae. *R. canadum* possui corpo  
12 alongado, subcilíndrico, fusiforme; cabeça larga e depressa e olhos pequenos. A boca é larga,  
13 terminal, com projeção maior da mandíbula; dentes viliformes na mandíbula, no céu da boca e  
14 na língua. A primeira nadadeira dorsal contém 7-9 (geralmente 8) curtos, porém fortes,  
15 espinhos isolados, não ligados por membrana; a segunda nadadeira dorsal é comprida, com  
16 raios anteriores elevados em adultos; nadadeiras peitorais pontudas, tornando-se falcadas com  
17 a idade; nadadeira anal similar a dorsal, mas curta; nadadeira caudal redonda em juvenis com  
18 raios centrais muito prolongados, e com o passar da idade, essa torna-se lunada em adultos  
19 (Figura 1). Linha lateral levemente ondulada na região anterior (Collette 1981, Shaffer &  
20 Nakamura 1989).

21 A coloração do monotípico Rachycentridae é composta por marrom-escuro na região  
22 superior, marrom-claro na região lateral e inferior, com uma faixa preta lateral estendendo-se  
23 do focinho, passando pelo olho, à base da nadadeira caudal, limitada acima e abaixo por uma  
24 banda pálida. A faixa preta lateral é acentuada em juvenis e tende a clarear em adultos. As  
25 nadadeiras são escuras, exceto as anal e pélvica, que são acinzentadas. Superfície ventral  
26 prateada com branco acinzentado. Esse teleósteo não apresenta dimorfismo sexual e é  
27 gonocorista (indivíduo que não apresenta reversão sexual) (Shaffer & Nakamura 1989).

28 O nome popular padrão da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e  
29 Alimentação – FAO (sigla em inglês) da espécie é em inglês: *cobia*, em francês: *mafou* e em  
30 espanhol: *cobie* (Collette 1981). Outros nomes populares são: bijupirá, beijupirá, pirambiju,  
31 cação de escama, falso tubarão, *lemonfish*, *crabeater*, *ling*, *black kingfish*, entre outras  
32 variações no Brasil e no mundo (ver Shaffer & Nakamura 1989).

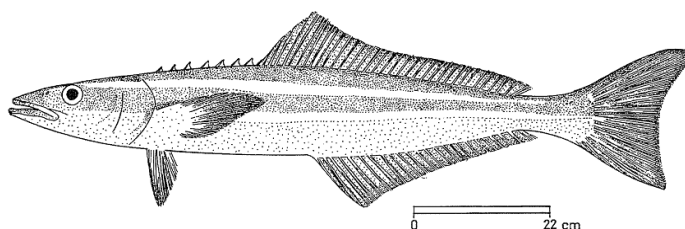


Figura 1 – Desenho ilustrado da *Rachycentron canadum* adulta (Collette 1981).

### 1.1.2 Importância econômica

Sumariamente, o bijupirá é uma espécie pelágica, migratória, carnívora, cosmopolita e não habituada a formar cardumes. Aliás, os hábitos solitários da espécie contribuem para o desconhecimento nacional, uma vez que não há pescaria em escala comercial específica e, conseqüentemente, sua comercialização ocorre em peixarias litorâneas de pequeno/médio porte quando ocorrem capturas acidentais, principalmente nos países ocidentais. Mesmo assim, o Brasil é o quinto maior país de produção capturada ficando atrás de Irã, Malásia, Filipinas e Paquistão (FAO 2009). Corroborando o tema, em 2007 o desembarque alcançou o valor de 10.484 t em todo o mundo, enquanto que no Brasil a estimativa aponta uma captura de 975 t, com destaque para as regiões Norte e Nordeste (FAO 2009, MPA 2009).

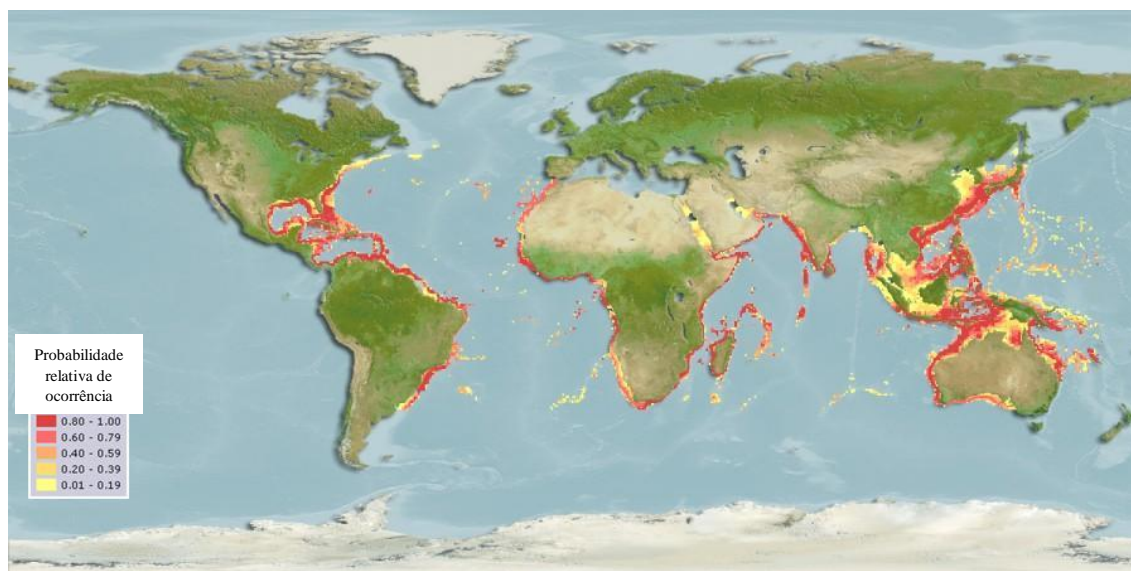
O bijupirá possui uma significativa importância econômica no segmento recreacional, sendo uma espécie apreciada na pesca esportiva por ser um peixe “brigador”, de difícil captura, principalmente no Golfo do México (Shaffer & Nakamura 1989, Kaiser & Holt 2005). Diferentemente do Ocidente, o bijupirá é um peixe famoso e valioso para os consumidores orientais, principalmente Japão e Taiwan. Nesses países, esse peixe possui alto valor comercial devido a sua carne branca, apreciada para consumo cru (*sashimi*) e, também pela sua barriga, que apresenta alto teor de lipídio (Miao *et al.* 2009). Em Taiwan, apenas o bijupirá movimentou uma produção em cativeiro de 4.268 t, em 2005, significando pouco mais US\$ 21 milhões (Miao *et al.* 2009).

### 1.1.3 Distribuição

63 *R. canadum* possui uma ampla distribuição em oceanos tropicais, subtropicais, e  
64 temperados quentes, exceto na região central e oriental do Pacífico (Briggs 1960, Shaffer &  
65 Nakamura 1989) (Figura 2). O bijupirá foi introduzido nos Mares: Mediterrâneo, Negro e  
66 Vermelho (Goren & Dor 1994, Golani *et al.* 2002). A maioria dos ovos, planctônicos e  
67 pelágicos, do bijupirá é encontrada em mar aberto. Conforme a espécie inicia sua fase  
68 nectônica, essa se desloca para águas costeiras, próxima às praias, desembocaduras de rios,  
69 ilhas barreiras ou baías com salinidades relativamente elevadas (Shaffer & Nakamura 1989).  
70 Quando adultos, são peixes costeiros e da plataforma continental e ocasionalmente entram em  
71 estuários (Robins & Ray 1986).

72 A distribuição do bijupirá é fortemente influenciada pela temperatura, pois a espécie  
73 prefere migrar para regiões quentes. Entretanto, podem ocorrer em águas temperadas durante  
74 os meses quentes do ano. A salinidade parece ser menos fundamental em sua distribuição já  
75 que são encontrados em diferentes ambientes. Porém, são encontrados em ambientes com  
76 grande variação de salinidade, preferencialmente em oceânicos ou de salinidades próximas à  
77 oceânica. Outro parâmetro que influencia na distribuição da espécie é a abundância de  
78 alimentos disponíveis, principalmente caranguejos e outros crustáceos (motivo pelo qual um  
79 dos nomes populares ser *crabeater*, *crab*: caranguejo e *eater*: alimentador, comedor) (Shaffer  
80 & Nakamura 1989).

81



82

83 Figura 2 – Probabilidade relativa de ocorrência do *Rachycentron canadum* (Froese & Pauly 2011).

84

85

#### 86 1.1.4 A criação de *R. canadum*

87

88

89 Devido às características biológicas da espécie, principalmente devido à excelente taxa  
90 de crescimento, que atinge entre 4 a 6 kg no primeiro ano de criação (Chou *et al.* 2001), o  
91 bijupirá foi eleito como uma espécie promissora na aquicultura e, assim, atraiu a atenção de  
92 governos, grandes grupos de investidores e até de famílias litorâneas que, conseqüentemente,  
93 incentivam e pressionam pesquisadores no mundo inteiro para melhorias e descobertas de  
94 técnicas de criação.

95 Os primeiros relatos da criação de bijupirá revelam que foi em Taiwan, no início dos  
96 anos 90, que essa espécie chamou a atenção para a aquicultura, quando os taiwaneses  
97 obtiveram as primeiras desovas em cativeiro (Liao *et al.* 2004). Entretanto, já em 1974,  
98 pesquisadores coletaram ovos selvagens do bijupirá na Carolina do Norte (EUA) e os criaram  
99 com êxito até 131 dias de idade (Hassler & Rainville 1975). Embora tenham registrado uma  
100 alta taxa de mortalidade nos primeiros dez dias após a eclosão, esses autores já evidenciaram  
101 o potencial dessa espécie à aquicultura devido ao seu rápido crescimento, facilidade de  
102 manejo e tolerância à variação das condições ambientais (Hassler & Rainville 1975).

103 Alguns países na Ásia, Oceania e Américas já o produzem comercialmente, porém, em  
104 pequena escala, ou, ainda, não reportada. A produção de bijupirá oriunda da aquicultura foi  
105 cerca de 30 mil toneladas em 2009, sendo somente a China e Taiwan os responsáveis pela  
106 produção (FAO 2009). Entretanto, os dados da produção pesqueira chinesa já foram  
107 desmascarados por um artigo publicado na *Nature*. Foi demonstrado que o sistema político  
108 chinês incentiva a superestimação dos dados de captura e produção doméstica de pescado  
109 (Watson & Pauly 2001, Pauly 2009). Dessa forma, apesar de o consumo *per capita* de  
110 pescado nos países orientais serem elevados (Smith *et al.* 2010), dados de produção da China  
111 são duvidosos.

112 Os sistemas de criação do bijupirá variam entre regiões e fases de criação. A  
113 manutenção dos reprodutores de bijupirá em cativeiro é feita em diversos sistemas. Há relatos  
114 de utilização do sistema de recirculação de água, em viveiros com sistema de fluxo contínuo e  
115 até mesmo em tanques redes oceânicos (Liao *et al.* 2004, Benetti *et al.* 2008a, Nhu *et al.*  
116 2010). A larvicultura é realizada em laboratório com tanques em sistema de fluxo contínuo ou  
117 de recirculação, ou ainda em viveiros escavados, quando em baixas densidades de estocagem.  
118 A fase de engorda é, predominantemente, realizada em tanques redes oceânicos *near-shore* e  
119 *off-shore* (Liao *et al.* 2004, Webb Jr. *et al.* 2007, Benetti *et al.* 2008a).

120 O que torna evidente em todos os sistemas de criação, bem como nas diferentes fases,  
121 é a exigência, principalmente, de altas concentrações de oxigênio dissolvido na água e,  
122 obviamente, como em toda escala intensiva de produção de organismos aquáticos, a  
123 manutenção dos demais parâmetros de qualidade de água em níveis no mínimo aceitáveis  
124 para aquela espécie. Assim, de modo geral, as fases de larvicultura e inicial de juvenis são  
125 realizadas no continente, enquanto a fase de engorda final é realizada no oceano (Webb Jr. *et*  
126 *al.* 2007).

127 A densidade de estocagem do bijupirá parece influenciar na performance das larvas e  
128 de juvenis de modo diferente. O crescimento bem como a sobrevivência de larvas de bijupirá  
129 parecem diminuir conforme o aumento da densidade de estocagem. A literatura sugere que a  
130 densidade de estocagem inicial de larvas recém eclodidas seja de 5 a 10 larvas/L e que os  
131 tanques de larvicultura do bijupirá com grandes diâmetros podem apresentar melhores  
132 resultados de crescimento e sobrevivência, já que as larvas aparentam predar  
133 preferencialmente na coluna superior da água (Hitzfelder *et al.* 2006).

134 Por outro lado, juvenis de bijupirá criados em densidades elevadas (0,22 e 0,44 g/L)  
135 não apresentam diferenças significativas de sobrevivência e ganho em peso em relação  
136 àqueles criados em baixa densidade (0,04 g/L) (Webb Jr. *et al.* 2007). Porém, foi verificado  
137 nesse mesmo estudo que os peixes juvenis criados em baixa densidade apresentaram uma pior  
138 eficiência alimentar comparado às densidades mais elevadas. Segundo os autores, esse fato  
139 ocorre, pois a agressividade e competição pelo alimento foram maiores entre os peixes criados  
140 em sistemas mais densos, onde os animais se alimentavam dos grãos de ração ainda na  
141 superfície da água, enquanto que em baixa densidade de estocagem os juvenis apenas se  
142 alimentavam quando o grão de ração chegava próximo ao fundo do tanque, dificultando a  
143 percepção de saciedade dos organismos.

144

145

#### 146 1.1.5 Efeitos da qualidade da água em *R. canadum*

147

148

149 Atwood *et al.* (2004) mostraram que para juvenis a temperatura letal mediana é 12,1°C  
150 e Hassler & Rainville (1975) mostraram que o limite superior é 37,7°C. Para engorda de  
151 juvenis, Sun *et al.* (2006) mostraram que a faixa considerada ótima compreende entre 27 a  
152 29°C. Um dado interessante é que apesar dos juvenis de bijupirá apresentarem uma taxa de  
153 crescimento inferior quando expostos a temperaturas inferiores (18 e 23°C), esses apresentam

154 crescimento compensatório quando são retornados ao ótimo térmico (29°C) (Schwarz *et al.*  
155 2007).

156 Alguns estudos reportaram o crescimento e a sobrevivência de juvenis de bijupirá em  
157 diferentes salinidades e sugerem que em baixas salinidades o bijupirá apresenta seu  
158 desempenho negativamente afetado, embora alguns resultados sejam conflitantes entre si  
159 (Denson *et al.* 2003, Atwood *et al.* 2004, Resley *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009). Num estudo  
160 de redução gradual da salinidade, a mortalidade de juvenis de bijupirá inicia quando a água  
161 atinge salinidade 8 e praticamente atinge 100% em salinidade 2 (Atwood *et al.* 2004). Denson  
162 *et al.* (2003) mostraram que o bijupirá teve menor crescimento em salinidade 5 comparado às  
163 salinidades 15 e 30 já na primeira biometria, realizada a cada 15 dias, durante um período de  
164 oito semanas. Todavia, mesmo sendo numericamente menor, a sobrevivência de juvenis de  
165 bijupirá criados em salinidade 5 não foi estaticamente diferente das salinidades maiores. Esse  
166 estudo sugeriu que os peixes criados na salinidade 5 estavam menos saudáveis comparados  
167 aos demais tratamentos, pois além de apresentarem valores percentuais estatisticamente  
168 menores de hematócrito, muitos desses peixes apresentaram nadadeiras erodidas, úlceras na  
169 pele e também estavam emaciados.

170 Corroborando o assunto, Chen *et al.* (2009) verificaram que juvenis de bijupirá criados  
171 em salinidade 5 apresentaram valores inferiores das taxas de conversão alimentar e de  
172 crescimento específico e diferiram estatisticamente dos tratamentos de salinidades superiores  
173 durante 15 dias do experimento. Além disso, o gasto energético dispensado para o  
174 crescimento foi significativamente menor nos peixes criados em salinidade 5 quando  
175 comparado a salinidade 30 e, conseqüentemente, o gasto energético do metabolismo na  
176 salinidade inferior foi maior comparado às salinidades superiores (Chen *et al.* 2009).

177 Por outro lado, Resley *et al.* (2006), em duas triagens para avaliar o desempenho de  
178 juvenis de bijupirá em três diferentes salinidades, 5, 15 e 30, verificaram que durante oito  
179 semanas os peixes criados em salinidade 5 cresceram tão bem ou melhor que os demais  
180 tratamentos. Porém, na última semana de uma das triagens, todos os tratamentos registraram  
181 mortalidades, e no tratamento 5 o percentual foi maior, de modo que diferiu estatisticamente  
182 dos demais tratamentos. Segundo os autores, uma possível explicação a esse fato pode ser a  
183 infestação do parasita *Coccidia* sp. em todos os tratamentos, porém aqueles criados na  
184 salinidade inferior foram os mais afetados por estarem mais susceptíveis a fatores estressantes  
185 e/ou doenças ou ainda o aumento da virulência do parasita em salinidades inferiores.

186 Essa divergência nos parâmetros zootécnicos do bijupirá criado em salinidade 5 pode  
187 ter como explicação a dieta utilizada nos tratamentos (Resley *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009).

188 Denson *et al.* (2003) e Chen *et al.* (2009) alimentaram os juvenis de bijupirá durante o  
189 experimento com dieta comercial e lula fresca, respectivamente. Já Resley *et al.* (2006)  
190 ofertaram uma dieta elaborada, que continha os mesmos os níveis de proteína e lipídio da  
191 dieta comercial, onde foram adicionados complexos comerciais mineral e vitamínico. Essa  
192 dieta suplementada pode favorecer a saúde dos peixes, já que alguns nutrientes podem estar  
193 aquém ou ausentes numa dieta comercial, como por exemplo o cálcio, que auxilia na  
194 prevenção de lesões musculares e osteopenia (Resley *et al.* 2006). Além da dieta, essas  
195 diferenças no crescimento podem ser causadas também por diferentes estratégias de  
196 aclimatação à baixa salinidade e pela composição iônica e alcalinidade da água (Sampaio &  
197 Tesser 2010)

198 As larvas de bijupirá respondem ao teste de estresse salino de modo similar as demais  
199 larvas de peixes marinhos, que são capazes de tolerar mudanças abruptas de salinidade por  
200 curtos períodos de tempo. O teste de estresse salino consiste da transferência imediata às  
201 salinidades extremas e avalia a sobrevivência num intervalo de tempo. Larvas de bijupirá  
202 exposta a salinidade 65 possuem menor índice de estresse quando comparadas aquelas  
203 expostas a salinidade zero (Salze *et al.* 2008).

204 Outros parâmetros de qualidade de água, como oxigênio dissolvido, pH e compostos  
205 nitrogenados, também já foram estudados (Atwood *et al.* 2004, Feeley *et al.* 2007, Rodrigues  
206 *et al.* 2007, Santos 2008). Sumariamente, o que se observa é que o bijupirá requer níveis de  
207 oxigênio dissolvido elevados e, como em atuns, uma elevada taxa metabólica permite ao  
208 bijupirá um rápido crescimento, já que garante levar aos tecidos oxigênio e substratos  
209 metabólicos necessários rapidamente (Feeley *et al.* 2007). O bijupirá não apresenta  
210 mortalidade quando criado por seis semanas em pH 5 ou 6, embora apresente menores taxas  
211 de crescimento e de conversão alimentar comparado aos juvenis criados em pH próximos da  
212 água marinha (Santos 2008). Juvenis apresentam uma tolerância a concentrações de amônia  
213 próxima as demais espécies marinhas, embora em criações intensivas os valores apresentados  
214 por Rodrigues *et al.* (2007) sejam facilmente encontrados. Nesse estudo, foi estimada a  
215 concentração letal para 50% dos juvenis de bijupirá experimentais é 1,13 mg N-NH<sub>3</sub>/l e o  
216 cessar da alimentação quando essa atinge 0,62 mg N-NH<sub>3</sub>/l. Quanto aos efeitos do nitrito,  
217 nota-se que o bijupirá é resistente a esse composto, pois a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>)  
218 sequer pôde ser estimada já que os valores das concentrações testadas foram baixos e apenas  
219 seis juvenis morreram no tratamento com a maior concentração (210 ppm) desse composto  
220 (Rodrigues *et al.* 2007).

221

222

## 223 1.1.6 Alimentação e nutrição do bijupirá

224

225

226 Apesar de a espécie possuir características vantajosas a sua criação, até aqui  
227 mencionadas, os aquicultores têm encontrado algumas frustrações principalmente na  
228 larvicultura, devido às elevadas taxas de mortalidade encontradas na fase inicial da  
229 alimentação exógena, onde as mudanças alimentares são dramáticas (Tang *et al.* 2010).  
230 Primeiramente, o bijupirá alimenta-se do saco vitelínico, uma vez que a larva ao eclodir não  
231 apresenta formação do olho, principal órgão sensorial para predação na maioria das espécies  
232 carnívoras, além de apresentar a boca e ânus fechados.

233 Embora ainda se alimente do saco vitelínico, a primeira alimentação exógena começa  
234 entre 2-3 dias após a eclosão, onde já ocorre a pigmentação dos olhos, bem como, a abertura  
235 da boca e do ânus (Faulk *et al.* 2007). Neste primeiro momento, dificilmente as larvas de  
236 teleósteos aceitam alimentos inertes e/ou que possuam ingredientes de natureza complexa,  
237 como é o caso da ração, principalmente porque não ocorre estímulo visual e seu aparato  
238 gastrointestinal é incipiente (Barnabé & Guissi 1994, Kolkovski 2001).

239 Dessa forma, a larvicultura do bijupirá deve oferecer alimento vivo nas primeiras  
240 alimentações e, comumente, essa é feita utilizando inicialmente o rotífero tipo “G”,  
241 *Brachionus plicatilis* ou náuplio de copépode, seguido de *Artemia* sp. O tempo, a escolha da  
242 espécie, o estágio de vida e o enriquecimento do alimento vivo ofertado, tanto com  
243 microalgas ou com produtos comerciais, variam entre os protocolos adotados em cada  
244 laboratório (Liao *et al.* 2004, Faulk & Holt 2005, Holt *et al.* 2007, Benetti *et al.* 2008a e  
245 2008b). Um sério fator que afeta a sobrevivência da larvicultura é o canibalismo e Salze *et al.*  
246 (2008) relataram que isso ocorre próximo ao 17º dia após a eclosão, quando as larvas de  
247 bijupirá tornam-se nectônicas.

248 Essas mudanças alimentares são reflexos da ontogenia gastrointestinal. As principais  
249 mudanças morfológicas do trato digestório ocorrem entre os dias 1-4 pós eclosão e depois  
250 desse período, as mudanças ontogenéticas consistem principalmente na diferenciação e  
251 crescimento das estruturas já existentes até o aparecimento das glândulas gástricas no  
252 estômago (aproximadamente 10 dias após a eclosão), que adquire o formato em “Y” aos 20  
253 dias após a eclosão (Faulk *et al.* 2007).

254 Além do bijupirá apresentar uma elevada taxa de mortalidade no início da alimentação  
255 exógena, outro fator preocupante ocorre quando alguns exemplos da atividade oferecem peixe



256 fresco para alimentar os peixes confinados, dos reprodutores à fase final da engorda (Nhu *et*  
257 *al.* 2010). Essa prática de alimentação é discutida na literatura e Naylor & Burke (2005)  
258 lançaram uma questão que cabe mencioná-la: “A aquicultura oferece um ganho ou uma perda  
259 líquida no suprimento de pescado no mundo?” (Naylor & Burke 2005).

260       Sendo assim, fica evidente que um dos “gargalos” da produção do bijupirá é a nutrição  
261 e, para tornar a atividade sustentável, mais pesquisas devem ser realizadas com objetivo de,  
262 primeiramente, conhecer as exigências nutricionais da espécie e, conseqüentemente, diminuir  
263 a utilização de pescado fresco e/ou insumos oriundos do pescado (farinha e óleo) na  
264 alimentação do bijupirá, que por sua vez diminui os custos na produção.

265       A esse respeito, a carência de dados é tamanha a ponto das dietas comerciais  
266 destinadas a criação de bijupirá serem baseadas naquelas destinadas a outras espécies  
267 marinhas mais estudadas, como a garoupa e a perca-gigante (Fraser & Davies 2009). Por ser  
268 predador de topo de cadeia, o bijupirá requer elevados níveis de proteína. O nível ótimo de  
269 proteína bruta para juvenis de bijupirá calculado é 44,5% (Chou *et al.* 2001). Apenas dois  
270 aminoácidos foram investigados sobre a exigência na dieta do bijupirá. Para melhores taxas  
271 de crescimento e conversão alimentar, foi verificado que são necessários 1,19% de metionina  
272 na presença de 0,67% de cisteína na dieta, enquanto que para a lisina, o recomendado é 2,33%  
273 (Zhou *et al.* 2006, 2007).

274       Com relação aos lipídios, foi observado que a necessidade varia de acordo com o  
275 estágio de desenvolvimento. Em juvenis, o conteúdo ótimo calculado para juvenis é 5,76%  
276 (Chou *et al.* 2001). Elevados níveis de lipídios parecem reduzir o crescimento, além de  
277 comprometer a saúde dos peixes. Além disso, o óleo de peixe é um ingrediente valioso  
278 economicamente e menores teores na dieta reduzem o custo da produção. Entretanto, Craig *et*  
279 *al.* (2006) lembram que os consumidores orientais de bijupirá, principalmente no Japão e  
280 Taiwan, preferem o consumo fresco (*sashimi*) e elevados teores de gordura acentuam o sabor  
281 do peixe. Adicionalmente, Salze *et al.* (2010) revelam que juvenis de bijupirá aceitam fontes  
282 alternativas de lipídios, como óleo de soja, sem apresentar prejuízos em seu desempenho.

283       Recentes estudos com o bijupirá são promissores a cerca da substituição/redução de  
284 farinha de peixe. Embora peixes de hábitos carnívoros sejam resistentes às proteínas de  
285 origem vegetal, pois apresentam alguns fatores antinutricionais, juvenis de bijupirá podem ser  
286 alimentados com dietas com substituição de até 40% da farinha de peixe por farelo de soja  
287 sem comprometer o crescimento e a eficiência alimentar (Chou *et al.* 2004, Zhou *et al.* 2005).  
288 Como sugerido por Salze *et al.* (2010), a substituição da farinha de peixe em dietas de bijupirá  
289 dificilmente será completa com apenas uma fonte alternativa de proteína. Assim, esses autores

290 conseguiram eliminar 100% da farinha de peixe concomitantemente com o óleo de peixe em  
291 dietas para juvenis de bijupirá sem comprometer o crescimento da espécie. Esse feito foi  
292 obtido através da mistura de três fontes protéicas: farinha de poliqueta, concentrado protéico  
293 de soja e levedura (Salze *et al.* 2010).

294 É interessante destacar que ao substituir os insumos de origem pesqueira na dieta por  
295 outros de origem vegetal, há um desbalanceamento em alguns nutrientes essenciais, como  
296 aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa, uma vez que esses estão reduzidos ou ausentes  
297 nos derivados vegetais. Além disso, os insumos vegetais também não são ricos em sais e  
298 sugere que nessa substituição ocorra também a suplementação de sal, como o NaCl que  
299 exerce papel fundamental na iono-osmorregulação. Desse modo, deve-se ter a preocupação de  
300 suplementar os nutrientes requeridos que não são ricos nas fontes alternativas. Para tanto, o  
301 conhecimento das necessidades nutricionais do bijupirá deve ser ampliado para atingir a  
302 sustentabilidade da atividade.

303

304

### 305 1.2 A criação de teleósteos marinhos em baixa salinidade

306

307

308 A aclimação de teleósteos marinhos em salinidades menores da água do mar é um  
309 tema antigo de interesse para a aquicultura e muitas pesquisas foram realizadas avaliando as  
310 respostas específicas das espécies em relação ao tema. Esse fenômeno pode ser, em parte,  
311 devido aos benefícios que a adaptação aos ambientes de baixa salinidades apresentam, como  
312 taxas de crescimento maiores e melhores taxas de conversão alimentar. O bacalhau *Gadus*  
313 *morua* exibiu melhor crescimento quando aclimatado a ambientes próximo ao ponto  
314 isosmótico (15) ou hiposmótico (7) comparado ao ambiente marinho (Lambert *et al.* 1994).  
315 Melhora no desempenho do crescimento também foi observado em “turbot” (*Scophthalmus*  
316 *maximus*) criado em salinidade 10 (Gaumet *et al.* 1995). Tsuzuki *et al.* (2007) demonstraram  
317 que, apesar de não haver diferença no crescimento de robalos (*Centropomus parallelus*)  
318 criados em diferentes salinidades, a atividade de enzimas digestivas e a conversão alimentar  
319 foi melhor na salinidade de 15, próxima ao ponto isosmótico.

320 Para melhor compreensão da criação de organismos marinhos em ambientes com  
321 salinidades diferentes da oceânica, primeiro deve-se ter claro o desafio fisiológico de iono e  
322 osmorregulação que esses naturalmente enfrentam. De um modo geral, os teleósteos marinhos  
323 possuem uma concentração interna de íons de aproximadamente 1/3 da água do mar e, dessa

324 forma, não estão em equilíbrio com o meio externo e apresentam dois problemas  
325 osmorregulatórios: a entrada de osmólitos e a perda de água para o mar, ambos por processos  
326 difusionais, ou seja, os teleósteos são hiposmóticos em relação ao meio em que vivem. Para  
327 contornar esse desafio de desidratação, os teleósteos ingerem água do mar onde tanto a água  
328 quanto o sal são absorvidos no intestino. A água fica retida no organismo enquanto que o sal é  
329 eliminado pelas brânquias, principalmente (Schmidt-Nielsen 2002). Os íons são introduzidos,  
330 em quantidades significativas, através das brânquias, da ingestão de água e da superfície  
331 corpórea, devido à sua relativa permeabilidade (Schmidt-Nielsen 2002).

332 As brânquias são o principal local de excreção de íons monovalentes em teleósteos  
333 marinhos. Esta transferência ocorre por meio de células especializadas denominadas células  
334 de cloreto (CC), também nomeadas de ionócitos ou células ricas em mitocôndrias (Willmer *et*  
335 *al.* 2005). As CC estão localizadas, principalmente, nos filamentos branquiais na região entre  
336 as bases das lamelas (Mylonas *et al.* 2009). Também podem ocorrer esparsamente nas  
337 lamelas, entretanto, quando ocorre uma proliferação dessas células, essas podem ser  
338 encontradas densamente no epitélio branquial, inclusive nas lamelas (Perry 1997). As CC são  
339 uma das quatro diferenciações celulares presentes no epitélio branquial e ocupam uma  
340 pequena fração da área superficial total (geralmente menos que 10%) das células epiteliais  
341 que são expostas ao ambiente (Perry & Laurente 1993). Os demais tipos de células branquiais  
342 são as células pavimentares, as células mucosas e as células neuro-epiteliais (Perry 1997).

343 Com base nas diferenças morfológicas e de localidade das CC, a literatura tem  
344 proposto que os teleósteos possuem dois subtipos celulares ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e, provavelmente, a  
345 funcionalidade desses subtipos também possa diferir (Pisam *et al.* 1995). As CC  $\alpha$  são  
346 localizadas predominantemente na base da lamela e são precursoras das CC em teleósteos  
347 adaptados à água marinha. Já as CC  $\beta$  são primariamente localizadas nos filamentos  
348 branquiais, na região inter-lamelar, e ocorrem somente em teleósteos que habitam águas  
349 doces. A membrana apical das células tipo  $\alpha$  apresenta muitas dobras e projeções, enquanto  
350 que nas células tipo  $\beta$  a membrana apical é lisa (Perry 1997).

351 De acordo com estudos de microscopia de transmissão eletrônica das CC, as células  $\alpha$   
352 estão envolvidas na excreção de  $\text{Cl}^-$  quando os peixes são transferidos para água marinha e  
353 também podem estar envolvidas na absorção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  em ambientes de água doce.  
354 No entanto, o papel das células  $\beta$  permanece obscuro (Pisam *et al.* 1995). Embora se sugira a  
355 existência de subtipos celulares de CC nas brânquias de teleósteos baseada nas evidentes  
356 diferenças (acima descritas) e no fato de existirem subtipos de células ricas em mitocôndrias  
357 em outros epitélios secretórios, a possibilidade de que essas células representam atividades

358 diferenciadas ou estágios de desenvolvimento de uma célula singular não pode ser descartada,  
359 como discutido por Perry (1997).

360 Na membrana basolateral das CC ocorre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (NKA), uma enzima que  
361 bombeia ativamente  $\text{Na}^+$  presente na célula para o meio extracelular. Esse transporte ativo faz  
362 com que a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  seja reduzida de forma que se estabelece um  
363 gradiente favorável a entrada desse íon na célula, principalmente via membrana apical (em  
364 contato com o meio externo). Teleósteos expostos a águas com salinidades próximas ao seu  
365 ponto isosmótico apresentam uma redução na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, exatamente por  
366 haver uma menor variação na concentração de íons entre aquelas águas e o plasma (Imsland *et*  
367 *al.* 2003). A perda de  $\text{Na}^+$  para o meio externo ocorre paracelularmente através de junções  
368 protéicas frouxas, adjacentes as CC (Baldisserotto 2009).

369 Uma vez compreendido os mecanismos da hiposmorregulação realizada pelos  
370 teleósteos marinhos na água do mar, seu ambiente natural, a criação desses em ambientes com  
371 salinidades reduzidas (abaixo de 10) requer a compreensão de um novo desafio: a  
372 osmolaridade plasmática (equivalente a salinidade entre 10-15) é maior que a concentração de  
373 osmólitos na água. Sendo assim, há uma tendência de esses organismos perderem íons para o  
374 meio, que se encontra hiposmótico em relação ao plasma animal e ganharem água. Portanto, é  
375 conveniente esperar que, ao menos por um período transitório (dias até semanas), ocorram  
376 respostas frente a essa situação. Efeitos nas características plasmáticas (níveis iônicos e  
377 osmolaridade), nas CC (número de células e subtipos) e na atividade das enzimas iono-  
378 osmorregulatórias (como a NKA) são alguns exemplos das estratégias adaptativas espécie-  
379 específica diretas (Perry 1997, Kelly *et al.* 1999, Kirschner 2004, Laiz-Carrión *et al.* 2005).

380 Como resultado da interação entre alterações no padrão das taxas metabólicas,  
381 consumo alimentar, e conversão alimentar, além do estímulo hormonal que a salinidade pode  
382 acarretar (Bouef & Payan 2001), muitas vezes, a salinidade afeta indiretamente o crescimento  
383 de teleósteos. Para a piscicultura comercial, que objetiva produzir um pescado de melhor  
384 qualidade num melhor custo econômico, isso deve ser considerado. Diante das análises da  
385 salinidade natural, da faixa de tolerância e da salinidade do melhor crescimento dentre as  
386 espécies mais estudadas, Bouef & Payan (2001) sugeriram que, de um modo geral, os peixes  
387 marinhos apresentam melhores desenvolvimento e/ou taxas de crescimento em salinidades  
388 intermediárias e os peixes de água doce em salinidades maiores que o seu ambiente natural.

389 Sendo assim, alguns fatores adversos podem ocorrer quando teleósteos marinhos são  
390 criados em salinidades reduzidas como o aumento do consumo alimentar, a diminuição da  
391 taxa de crescimento e a vulnerabilidade a patógenos (Resley *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009).

392 Isso ocorre, em parte, devido ao desafio exposto acima da hiperosmorregulação, ou seja, os  
393 teleósteos marinhos perdem passivamente íons como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa perda  
394 deve ser compensada pela recaptação ativa desses íons através da água e/ou alimento  
395 (Schmidt-Nielsen 2002). Portanto, para reduzir os custos energéticos dispensados na iono-  
396 osmorregulação, disponibilizar esses íons na dieta pode ser uma medida mitigadora dos  
397 efeitos negativos da criação em baixas salinidades.

398

399

### 400 1.3 Adição de sal na dieta

401

402

403 Alguns teleósteos marinhos eurialinos apresentam melhor crescimento em água de  
404 baixa salinidade, ou até mesmo em água doce, quando é feita suplementação de sal em sua  
405 dieta. O robalo europeu *Dicentrarchus labrax* quando criado em água doce alimentado com  
406 dieta enriquecida com NaCl teve sua taxa de crescimento aumentada em 19% (Eroldogan *et*  
407 *al.* 2005). A dourada *Sparus aurata* também apresentou melhoras na taxa de crescimento e  
408 sobrevivência quando foi alimentada com dietas salgadas, criada em salinidade 2,9  
409 (Appelbaum & Arockiaraj 2009). Espécies de água doce também apresentam melhora no  
410 desempenho de crescimento quando alimentadas com dietas suplementadas de sal, como a  
411 carpa comum, o rohu e a tilápia (Nandeeshia *et al.* 2000, Gangadhara *et al.* 2004, Cnnani *et al.*  
412 2010).

413 A suplementação de sal na dieta foi estudada em *Sciaenops ocellatus*, um teleósteo  
414 marinho, em diferentes salinidades. Foi verificado que a suplementação de sal na dieta (2%)  
415 foi suficiente para otimizar a taxa de crescimento e a eficiência alimentar quando criado em  
416 água doce. Entretanto, a adição de sal não surtiu efeito quando o *S. ocellatus* foi mantido em  
417 água salobra (5) ou em água marinha, sugerindo que a quantidade de íons dissolvidos na  
418 salinidade 5 é suficiente para as necessidades fisiológicas e assim os efeitos da dieta salgada  
419 nessa salinidade ou numa maior foram negligenciados (Gatlin *et al.* 1992).

420 Salman & Eddy (1987) também observaram uma relação entre a atividade enzimática  
421 NKA e o número de células de cloreto com dietas enriquecidas de sal. Esses autores  
422 demonstraram que a truta arco-íris, em água doce, exibiu um aumento significativo na  
423 atividade da NKA conforme o aumento do nível de NaCl na dieta. Esse comportamento  
424 também foi acompanhado pelo aumento do número de células de cloreto (Salman & Eddy  
425 1987).

426 Ainda, Perry *et al.* (2006) observaram que alimentando a truta arco-íris com dieta  
427 adicionada de sal, criada em água doce, provoca a mesma alteração no fenótipo branquial que  
428 ocorre quando há a transferência de peixes da água doce para ambiente marinho, como o  
429 aumento no número de CC. Aliás, alguns estudos sugeriram a eficácia do uso de sal na dieta  
430 na pré aclimação de transferências para água oceânica em salmonídeos (Zaugg *et al.* 1983,  
431 Salman & Eddy 1987, Staurnes & Finstad 2000).

432 Dietas suplementadas com NaCl tem sido amplamente utilizadas na piscicultura há  
433 pelo menos três décadas, principalmente em salmonídeos (Salman & Eddy 1988). Além da  
434 ração já conter certa quantidade de sal, os piscicultores fazem uso da adição de sal na dieta  
435 como uma prática comum em países com elevadas produções, como Índia e China  
436 (Gangadhara *et al.* 2004). Grande porcentagem do sal presente na ração é oriunda da farinha  
437 de peixe, um componente cada vez mais nobre (tanto no ponto de vista econômico como  
438 ecológico) e, conseqüentemente, cada vez mais substituído nas dietas utilizadas na  
439 aquicultura.

440 Cnaami *et al.* (2010) chamam a atenção para algumas tendências da aquicultura  
441 “moderna”, onde estudos com a adição de sal na dieta poderão ser ainda mais importantes.  
442 Primeiro, em sistema de água doce, a utilização de sistemas de recirculação de água onde há  
443 uma renovação limitada da água e sem alimento natural que pode acarretar uma carência de  
444 íons no sistema. Além disso, essa carência pode ser ainda mais acentuada se for considerado  
445 que, devido ao alto custo e a limitada disponibilidade da farinha de peixe, rica em sal, as  
446 indústrias de ração estão motivadas a utilizarem fontes alternativas de proteínas,  
447 principalmente de origem vegetal, que não são ricas em sal (Cnaami *et al.* 2010).

448 Talvez ainda pouco explorado diante da relevância do tema de redução/substituição da  
449 farinha de pescado, o uso da dieta salgada pode contribuir com essa tendência, pois os íons  
450 Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> exercem papéis importantes na absorção dos nutrientes. Primeiro, pelo simples fato  
451 de que ao adicionar um ingrediente (sal) numa ração comercial, automaticamente, há uma  
452 diluição dos nutrientes da dieta (Salman & Eddy 1988). Depois, e mais importante, a absorção  
453 de aminoácidos e monossacarídeos ocorrem através de simportes aminoácidos/Na<sup>+</sup> e  
454 glicose/Na<sup>+</sup>, respectivamente, além de alguns desses simportes também serem dependentes de  
455 Cl<sup>-</sup> (Baldisserotto 2009).

456 Adicionalmente, a absorção de lipídios, principalmente os ácidos graxos de cadeia  
457 longa, embora não ocorra através de simportes dependentes desses íons, é auxiliada pelos sais  
458 biliares, e esses sim são reabsorvidos para formarem novamente a bile através de um simporte  
459 sal biliar/Na<sup>+</sup> (Baldisserotto 2009).

460           Apenas para exemplificar, um estudo realizado com a perca-gigante *Lates calcarifer*  
461 em água marinha, comparou dois grupos, um alimentado com uma dieta basal (controle) e  
462 outro dieta basal + NaCl (DS). Os resultados desse trabalho mostram que a adição de sal em  
463 dietas, embora não tenha aprimorado a taxa de crescimento em água marinha, induziu o  
464 aumento da atividade de enzimas envolvidas na digestão dos alimentos (Harpaz *et al.* 2005).  
465 O interessante é que a perca-gigante, através do aumento da atividade das enzimas digestivas,  
466 aumentou o nível dos produtos finais (glicose e aminoácido) quando houve uma maior  
467 concentração de Na<sup>+</sup> no lúmen intestinal (via dieta). E, como não houve diferença no  
468 crescimento entre os grupos controle e DS (mesmo com a diluição dos nutrientes), fica  
469 sugerido que o sal na dieta, no mínimo, melhorou na absorção dos nutrientes.

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494 **2 Objetivos**

495

496

497 *2.1 – Geral*

498

499

500 Avaliar o desempenho de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* criados em  
501 salinidade reduzida e verificar as implicações de diferentes níveis de NaCl adicionados na  
502 dieta ofertada.

503

504

505 *2.2 – Específicos*

506

507 2.2.1 – Estudar os efeitos da suplementação do sal na dieta sobre o crescimento e a  
508 sobrevivência dos juvenis de bijupirá na salinidade 5;

509

510

511 2.2.2 – Estudar o comportamento da atividade enzimática  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ /ATPase das  
512 brânquias de juvenis de bijupirá criados em baixa salinidade e alimentados com dieta  
513 suplementada com sal;

514

515

516 2.2.3 – Observar as modificações histológicas das brânquias dos peixes submetidos à  
517 baixa salinidade alimentados com dietas salgadas;

518

519

520 2.2.4 – Determinar o efeito da suplementação do sal sobre a composição corporal de  
521 juvenis de bijupirá.

522

523

524

525

526



527 **Referências Bibliográficas**

- 528 APPELBAUM, S & AJ AROCKIARAJ. 2009. Salt incorporated diets for enhancing growth  
529 performance and survival in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. juveniles reared in  
530 low saline brackish water. *Sci. Mar. (Barc.)*, 73(S1): 213–217.
- 531 ATWOOD, HL, SP YOUNG, JR TOMASSO & TIJ SMITH. 2004. Resistance of cobia,  
532 *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high  
533 environmental nitrite concentrations. *J. Appl. Aquacult.*, 15: 191–195.
- 534 BALDISSEROTTO, B. 2009. Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura. 2ª Ed. Santa Maria,  
535 Editora UFSM. 352 p.
- 536 BARNABÉ, G & A GUISSI. 1994. Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea  
537 bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding  
538 regime. *Aquacult. Fish. Manage.*25: 537–546.
- 539 BENETTI, DD, MR ORHUM, B SARDENBERG, B O’HALON, A WELCH, R HOENIG, I  
540 ZINK, JA RIVERA, B DENLINGER, D BACOAT, K PALMER & F CAVALIN,  
541 2008a. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum*  
542 (Linnaeus). *Aquacult. Res.* 39: 701–711.
- 543 BENETTI, DD, B SARDENBERG, A WELCH, R HOENIG, MR ORHUN & I ZINK.2008b.  
544 Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*.  
545 *Aquaculture.*281: 22–27.
- 546 BOUEF, G & P PAYAN. 2001. How should salinity influence fish growth? –Review. *Comp.*  
547 *Biochem. Physiol., C.* 130: 411–423.
- 548 BRIGGS, JC. 1960. Fishes of worldwide (circumtropical) distribution. *Copeia* 3, 171–180p.  
549 Disponível em: <http://www.wku.edu/~smithch/biogeog/BRIG1960.htm>. Acesso em:  
550 24/jan./2011.
- 551 CHEN, G, Z WANG, Z WU & B GU. 2009. Effects of salinity on growth and energy budget  
552 of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *J. World Aquacult. Soc.*40: 374–382.
- 553 CHOU, R-L, MS SU & HY CHEN. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile  
554 cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture.*193: 81–89.
- 555 CHOU, R-L, YB HER, MS SU, G HWANG, H WUY & HY CHEN 2004. Substituting fish  
556 meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*.  
557 *Aquaculture.*229: 325–333.
- 558 CNAANI, A, A BARKI, T SLOSMAN, A SCHARCANSKI, A MILSTEIN & S HARPAZ.  
559 2010. Dietary salt supplement increases the growth rate in freshwater cultured tilapia  
560 hybrids. *Aquacult. Res.* 41: 1545–1548.

- 561 COLLETTE, BB. 1981. Rachycentridae. In: FISCHE, W, G BIANCHI & WB SCOTT (eds.)  
562 FAO species identification guide for fishery purposes. Western Central Atlantic (Fishing  
563 Area 31), Volume 3. FAO, Rome.
- 564 CRAIG, SR, MH SCHWARZ & E MCLEAN. 2006. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)  
565 can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production  
566 characteristics. *Aquaculture*.261: 384–391.
- 567 DENSON, MR, KR STUART, TIJ SMITH, CR WEIRICH & A SEGARS. 2003. Effects of  
568 salinity on growth, survival, and selected hematological parameters on juvenile cobia,  
569 *Rachycentron canadum*. *J. World Aquacult. Soc.*34: 496–504.
- 570 EROLDOGAN, OT, M KUMLU, M KIR & GA KIRIS. 2005. Enhancement of growth and  
571 feed utilization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed supplementary  
572 dietary salt in freshwater. *Aquacult. Res.* 36: 361–369.
- 573 FAO. 2009. Fishstat plus Vers. 2.3.2000: Universal software for fishery statistical time series:  
574 Aquaculture production 1950–2007; Capture production 1950–2007. FAO Fisheries and  
575 Aquaculture Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit.
- 576 FAULK, CK & GJ HOLT. 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in  
577 recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and green water culture.  
578 *Aquaculture*.249: 231–243.
- 579 FAULK, CK, AD BENNINGHOFF, GJ HOLT. 2007. Ontogeny of the gastrointestinal tract  
580 and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *J. Fish. Biol.*70:  
581 567–583.
- 582 FAULK, CK & GJ HOLT. 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned  
583 cobia *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture*.279: 70–76.
- 584 FEELEY, MW, DD BENETTI & JS AULT. 2007. Elevated oxygen uptake and high rates of  
585 nitrogen excretion in early stages of the cobia *Rachycentron canadum* (L.), a fast-  
586 growing subtropical fish. *J. Fish Biol.*71: 1662–1678.
- 587 FRASER, TWK & SJ DAVIES. 2009. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron*  
588 *canadum* (Linnaeus): a review. *Aquacult. Res.* 40: 1219–1234.
- 589 FROESE, R & D PAULY (Eds). 2010. Search FishBase. Disponivel em:  
590 <http://www.fishbase.org>, version (11/2010). Acesso em: 24/jan./2011.
- 591 GANGADHARA, B, MC NANDEESHA, P KESHAVANATH & TJ VARGHESE. 2004.  
592 Growth response and biochemical composition of rohu, *Labeo rohita*, fed salt-  
593 incorporated diets. *J. Appl. Aquacult.*16(1): 169–176.

- 594 GATLIN, DM, DS MACKENZIE, SR CRAIG & WH NEILL. 1992. Effects of dietary  
595 sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. *Prog. Fish-*  
596 *Cult.*54: 220–227.
- 597 GAUMET, F, G BOEUF, A SEVERE, A LE ROUX & N MAYER-GOSTAN. 1995. Effects  
598 of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. *J. Fish Biol.* 47: 865–876.
- 599 GOLANI, D, LO RELINI, E MASSUTÍ & J-P QUIGNARD. 2002. CIESM atlas of exotic  
600 species in the Mediterranean. Vol. 1. Fishes. F. Briand (ed.). CIESM Publishers,  
601 Monaco. 256p.
- 602 GOREN, M & M DOR. 1994. An updated checklist of the fishes of the Red Sea (CLOFRES  
603 II). The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel. 120p.
- 604 HARPAZ, S, Y HAKIMA, T SLOSMANA & OT EROLDGAN. 2005. Effects of adding  
605 salt to the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water  
606 recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture.*248: 315–  
607 324.
- 608 HASSLER, WW & RP RAINVILLE. 1975. Techniques for hatching and rearing cobia,  
609 *Rachycentron canadum*, through larval and juvenile stages. Univ. N.C. Sea Grant  
610 Coll.Prog., Raleigh. 26p.
- 611 HITZFELDER, GM, GJ HOLT, JM FOX & DA MCKEE. 2006. The effect of rearing density  
612 on growth and survival of cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed  
613 recirculating aquaculture system. *J. World Aquac. Soc.*37: 204–209.
- 614 HOLT, GJ, CK FAULK & MH SCHWARZ. 2007. A review of the larviculture of cobia  
615 *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture.*268: 181–187.
- 616 IMSLAND, AK, S GUNNARSSON, A FOSS & SO STEFANSSON. 2003. Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-  
617 ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus*  
618 *maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture.*218: 671–683.
- 619 KAISER, JB & GJ HOLT. 2005. Species profile: Cobia. Southern regional aquaculture center  
620 publication, number 7202. Disponível em: <http://www.ca.uky.edu/wkrec/cobia.pdf>.  
621 Acesso em: 24 jan. 2011
- 622 KELLY, SP, INK CHOW & NYS WOO. 1999. Alterations in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and  
623 gill chloride cell morphometrics of juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*) in  
624 response to salinity and ration size. *Aquaculture.*172: 351–367.
- 625 KIRSCHNER, LB. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating  
626 aquatic animals. Review. *J. Exp. Biol.* 207: 1439–1452

- 627 KOLKOVSKI, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and  
628 applications to formulated diets. *Aquaculture*. 200: 181–201.
- 629 LAIZ-CARRIÓN, R, S SANGIAO-ALVARELLOS, JM GUZMÁN, MPM RÍO, JL  
630 SOENGAS & JM MANCERA. 2005. Growth performance of gilthead sea bream  
631 *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and  
632 energy metabolism. *Aquaculture*.250: 849–861.
- 633 LAMBERT, Y, JD DUTIL & J MUNRO. 1994. Effects of intermediate and low salinity  
634 conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Can. J.*  
635 *Fish. Aquat. Sci.*51: 1569–1576.
- 636 LIAO, IC, TS HUANG, WS TSAI, CM HSUEH, SL CHANG & EM LEAÑO. 2004. Cobia  
637 culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*.237: 155–165.
- 638 LINNAEUS, C. 1766. *Systema natura*, 12<sup>th</sup> ed., Brit. Min. Nat. Hist., London. 491p.
- 639 MIAO, S, CC JEN, CT HUANG & S HU. 2009. Ecological and economic analysis for cobia  
640 *Rachycentron canadum* commercial cage culture in Taiwan. *Aquacult. Int.* 17: 125–141.
- 641 MPA. 2009. Boletim estístico da pesca e aquicultura – Brasil 2008-2009. Brasília, Ministério  
642 da Pesca e Aquicultura. 99p.
- 643 MYLONAS, CC, M PAVLIDIS, N PAPANDROULAKIS, MM ZAISS, D TSAFARAKIS,  
644 IE PAPADAKIS & S VARSAMOS. 2009. Growth performance and osmoregulation in  
645 the shi drum (*Umbrina cirrosa*) adapted to different environmental salinities.  
646 *Aquaculture*.287: 203–210.
- 647 NANDEESHA, MC, B GANGADHARA, P KESHAVANATH & TJ VARGHESE. 2000.  
648 Effect of dietary sodium chloride supplementation on growth, biochemical composition  
649 and digestive enzyme activity of young *Cyprinus carpio* (Linn.) and *Cirrhinus mrigala*  
650 (Ham.). *J. Aqua. Trop.* 15: 135–144.
- 651 NAYLOR, R & M BURKE. 2005. Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea.  
652 *Annu. Rev. Environ. Resour.*30: 185–218.
- 653 NHU, VC, HQ NGUYEN, TL LE, MT TRAN, P SORGELOOS, K DIERCKENS, H  
654 REINERTSEN, E KJØRSVIK & N SVENNEVIG. 2010. Cobia *Rachycentron canadum*  
655 aquaculture in Vietnam: Recent developments and prospects. *Aquaculture*.doi:  
656 10.1016/j.aquaculture.2010.07.024
- 657 PAULY, D. 2009. Beyond duplicity and ignorance in global fisheries. *Sci. Mar. (Barc.)* 73(2):  
658 215–224.

- 659 PERRY, SF & P LAURENT. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function.  
660 In: RANKIN, JC & FB JENSEN. Fish Ecophysiology. London, Chapman & Hall. Chap.  
661 9: 231–264.
- 662 PERRY, SF. 1997. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes.  
663 *Annu. Rev. Physiol.*59: 325–347.
- 664 PERRY, SF, L RIVERO-LOPEZ, B MCNEILL & J WILSON. 2006. Fooling a freshwater  
665 fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *J.*  
666 *Exp. Biol.*209: 4591–4596.
- 667 PISAM, M, CL MOAL, B AUPERIN, P PRUNET & A RAMBOURG. 1995. Apical  
668 structures of “mitochondria-rich”  $\alpha$  and  $\beta$  cells in euryhaline fish gill: their behaviour in  
669 various living conditions. *Anat. Rec.*241: 13–24.
- 670 RESLEY, MJ, KA WEBB & GJ HOLT. 2006. Growth and survival of juvenile cobia,  
671 *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system.  
672 *Aquaculture.*253: 398–407.
- 673 ROBINS, CR & GC RAY. 1986. Field guide to Atlantic coast fishes of North America.  
674 Houghton Mifflin Co., Boston. 354 p.
- 675 RODRIGUES, RV, MH SCHWARZ, BC DELBOS, LA SAMPAIO. 2007. Acute toxicity  
676 and sub lethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*.  
677 *Aquaculture.*271: 553–557.
- 678 SALMAN, NA & FB EDDY. 1987. Response of chloride cell numbers and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -  
679 ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt  
680 feeding. *Aquaculture.*61: 41–48.
- 681 SALMAN, NA & FB EDDY. 1988. Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake  
682 and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson).  
683 *Aquaculture.*70: 131–144.
- 684 SALZE, G, E MCLEAN, MH SCHWARZ & SR CRAIG. 2008. Dietary mannan  
685 oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia.  
686 *Aquaculture.*274: 148–152.
- 687 SALZE, G, E MCLEAN, PR BATTLE, MH SCHWARZ & SR CRAIG. 2010. Use of soy  
688 protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish  
689 oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture.* 298: 294–299.
- 690 SAMPAIO, LA & MB TESSER. 2010. Cultivo do bijupirá (*Rachycentron canadum*). In:  
691 BALDISSEROTTO, B & LC GOMES (eds.). Espécies nativas para piscicultura no  
692 Brasil. 2ª Ed. Santa Maria, Editora UFSM. Cap. 20: 521-540.

- 693 SANTOS, RA. 2008. Crescimento e sobrevivência de juvenis de bijupirá *Rachycentron*  
694 *canadum* expostos ao estresse ácido crônico em sistema de recirculação de água.  
695 Monografia (Graduação) – Curso de Oceanologia, Universidade Federal do Rio Grande.  
696 22p.
- 697 SCHAFFER, RV & EL NAKAMURA. 1989. Synopsis of biological data on the cobia  
698 *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82,  
699 FAO Fisheries Synopsis 153. Springfield, NOAA. 32p.
- 700 SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente. 5ª Ed. Santos  
701 Livraria e Editora. 319-320p.
- 702 SCHWARZ, MH, D MOWRY, E McLEAN & SR CRAIG. 2007. Performance of advanced  
703 juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, reared under different thermal regimes:  
704 evidence for compensatory growth and a method for cold banking. *J. App. Aquacult.*19:  
705 71–84.
- 706 SMITH, MD, CA ROHEIM, LB CROWDER, BS HALPERN, M TURNIPSEED, JL  
707 ANDERSON, F ASCHE, L BOURILLÓN, AG GUTTORMSEN, A KHAN, LA  
708 LIGUORI, A MCNEVIN, MI O’CONNOR, D SQUIRES, P TYEDMERS, C  
709 BROWNSTEIN, K CARDEN, DH KLINGER, R SAGARIN & KA SELKOE. 2010.  
710 Sustainability and Global Seafood. *Science*.327: 784–786.
- 711 STAURNES, M & B FINSTAD. 2000. The effects of dietary NaCl supplement on hypo-  
712 osmorregulatory ability and sea water performance of Artic charr (*Salvelinus alpinus*  
713 L.) smolts. *Aquacul. Res.* 31: 737–743.
- 714 SUN, L, H CHEN & L HUANG. 2006. Effect of temperature on growth and energy budget of  
715 juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*.261: 872–878.
- 716 TANG, BG, G CHEN & ZH WU. 2010. Application of a microdiet in cobia *Rachycentron*  
717 *canadum* (Linnaeus, 1766) larvae rearing. *Aquacult. Res.* 41: 315–320.
- 718 TSUZUKI, M, J SUGAI, JC MACIEL, CJ FRANCISCO & VR CERQUEIRA. 2007.  
719 Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook  
720 (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*.271: 319–325.
- 721 WATSON, R & D PAULY. 2001. Systematic distortions in world fisheries catch trends.  
722 *Nature*.414: 534–536.
- 723 WEBB JR., KA, GM HITZFELDER, CK FAULK & GJ HOLT. 2007. Growth of juvenile  
724 cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture  
725 system. *Aquaculture*.264: 223–227.

- 726 WILLMER, P, G STONE & I JOHNSTON. 2005. Environmental physiology of animals. 2<sup>nd</sup>  
727 ed. Malden, Blackwell. 51–74p.
- 728 ZAUGG, WS, DD ROLEY, EF PRENTICE, KX GORES & FW WAKITZ. 1983. Increased  
729 seawater survival and contribution to the fishery of chinook salmon (*Oncorhynchus*  
730 *tshawytscha*) by supplemental dietary salt. *Aquaculture*.32: 183–188.
- 731 ZHOU, QC, KS MAI, BP TAN & J LIUY. 2005. Partial replacement of fishmeal by soybean  
732 meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquacult. Nutr*.11: 175–182.
- 733 ZHOU, QC, ZH WU, BP TAN, SY CHI & QH YANG. 2006. Optimal dietary methionine  
734 requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*.258: 551–557.
- 735 ZHOU, QC, ZH WU, SY CHI & QH YANG. 2007. Dietary lysine requirement of juvenile  
736 cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 273: 634–640.
- 737

**CAPÍTULO ÚNICO** – Artigo científico da presente dissertação para submissão em periódico internacional.

Juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* criados em salinidade reduzida: A adição de NaCl na dieta pode melhorar o desempenho do crescimento e a osmorregulação?

Renato Adriano dos Santos

Autores: Adalto Bianchini, Marianna Basso Jorge, Luis Alberto Romano, Luís André Sampaio e Marcelo Borges Tesser

Artigo elaborado segundo normas da revista *Aquaculture*



1 **Juvenile cobia *Rachycentron canadum* reared in low-salinity water: Does dietary sodium**  
2 **chloride affect growth and osmoregulation?**

3

4 Renato A. Santos<sup>a</sup>, Adalto Bianchini<sup>b</sup>, Marianna B. Jorge<sup>b</sup>, Luis A. Romano<sup>a</sup>, Luís A.  
5 Sampaio<sup>a</sup>, Marcelo B. Tesser<sup>a\*</sup>

6

7 <sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – Instituto de Oceanografia – Universidade  
8 Federal do Rio Grande (FURG), Rua do Hotel, nº 02. 96201-900, Querência, Rio Grande, RS,  
9 Brazil

10

11 <sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália  
12 km 8, Campus Carreiros , 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

13

14 \*Corresponding author: Tel./Fax.: +55 53 3236 8042;. Email address: mbtesser@gmail.com  
15 (M.B. Tesser)

16

## 17 **Abstract**

18 The effects of dietary salt (NaCl) supplementation (0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0% dry weight of  
19 a basal diet) on growth performance, gill histological alterations, and osmoregulation of  
20 juvenile cobia reared in low-salinity water (5 psu) were assessed. Fish were fed twice a day  
21 until satiation for 40 days. At the end of experiment, gills were sampled for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  
22 activity determination and histological evaluation. In all treatments, no mortality was  
23 observed after 40 days of experiment. Results showed that dietary NaCl supplementation did  
24 not alter growth of juvenile cobia reared in low-salinity water. At the highest NaCl levels (7.5  
25 and 10.0% supplementation), juvenile cobia showed higher feed intake and feed conversion  
26 rate. Branchial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was higher in fish fed with diet no salt added than in  
27 those fed with salty diets, and significant differences from the dietary saltless group were  
28 observed at 2.5, 5.0 and 7.0% dietary NaCl supplementation. The number of chloride cells  
29 significantly increased with augmenting dietary salt level, being 2.5-fold higher in fish fed  
30 with 10.0% dietary NaCl supplementation (41 cells mm<sup>-2</sup>) than in those from the control  
31 group (16 cells mm<sup>-2</sup>). These findings indicate that dietary salt supplementation stimulated  
32 chloride cells proliferation paralleled with a reduction in the gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity,  
33 suggesting a possible decrease in energy consumption associated with osmoregulation.  
34 However, the suggested energy sparing did not have a significant impact on juvenile cobia  
35 growth.

36  
37 **Keywords:** Chloride cells; dietary salt; hyper-osmoregulation; marine fish; salinity; Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-  
38 ATPase.

## 40 **1. Introduction**

41  
42 Development and growth of teleost fish are generally influenced by environmental  
43 salinity (Bouef and Payan, 2001). Salinity can affect osmoregulatory processes through  
44 alterations in the number of chloride cells and/or modulation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)  
45 activity, an essential enzyme for ionic and osmotic balance (McCormick, 2001; Hirose et al.,  
46 2003). Furthermore, water salinity has also shown to influence the nutritional status of  
47 euryhaline teleosts (Woo and Kelly, 1995).

48 In low-salinity water, fish face the physiological challenge of diffusive loss of ions  
49 such as Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> and osmotic gain of water. In order to counteract these processes, they  
50 rely on the active uptake of ions from water and/or diet (Schmidt-Nielsen, 1997; Gangadhara

51 et al., 2004). Some studies suggested that dietary salt supplementation might improve ion  
52 uptake and, consequently, enhance growth and help fish during acclimation to different  
53 salinities (Staurnes and Finstad, 2000; Perry et al., 2006; Cnaani et al., 2010).

54 *Cobia* *Rachycentron canadum* (L.) (Rachycentridae) is a marine teleost fish tolerant to  
55 a wide range of salinities (Shaffer and Nakamura, 1989; Atwood et al., 2004; Resley et al.,  
56 2006). *Cobia* is widely distributed in tropical and subtropical regions, being found in warm  
57 temperate seawater (Shaffer and Nakamura, 1989; Chou et al., 2001) at the marine shelf,  
58 offshore pelagic, and in estuarine waters (Ditty and Shaw, 1992). The commercial interest in  
59 *cobia* is increasing around the world, including in Brazil. Fast growth rate and adaptability to  
60 aquaculture systems, meat quality and market value are some aspects that elect this species as  
61 an excellent candidate for aquaculture (Chou et al., 2001; Liao et al., 2004). However, it was  
62 shown that growth and food conversion efficiency are significantly lower in juveniles *cobia*  
63 reared in low-salinity (5 psu) than in those reared in high-salinity (30 psu) (Denson et al.,  
64 2003; Chen et al., 2009).

65 In light of the above, rearing a marine species in low-salinity water could be  
66 interesting for commercial culture in sites distant from coastal areas. Advantages are  
67 associated with lower land prices, proximity of local markets and facility in obtaining licenses  
68 (Resley et al., 2006). Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of  
69 dietary salt supplementation on growth performance, osmoregulation and gill histological  
70 alterations of juvenile *cobia* reared at low-salinity water (5 psu).

71

## 72 **2. Material and methods**

73

### 74 *2.1 Fish acclimation*

75

76 The present study was conducted at the Marine Aquaculture National Laboratory  
77 (LaNAM, Ilha Comprida, São Paulo, SP, Brazil), where *cobia* juveniles ( $N=400$ ) were reared.  
78 Prior to the experiments, fish were acclimated in tanks (8,000 L) filled with aerated seawater  
79 at salinity 25, 25°C and photoperiod of 14 h light: 10 h dark. They were fed *ad libitum* twice a  
80 day with a repelletized (5 mm diameter) commercial diet (NRD 2/5, INVE, USA). During the  
81 acclimation period, water salinity was reduced in 5 units per day until to achieve the desired  
82 salinity (5 psu). Seawater was diluted with underground freshwater, assuring a renewal rate of  
83 approximately 25% per day. Freshwater and seawater were chlorinated and dechlorinated

84 before use. Juvenile fish were then kept in tanks containing water at the acclimation salinity  
85 (5 psu) for one week. The acclimation medium was 50% renewed every day. No fish  
86 mortality was observed during the acclimation period.

87

## 88 *2.2 Experimental design and diets*

89

90 Fish were individually weighed ( $12.02 \pm 0.62$  g, average  $\pm$  standard deviation) and  
91 randomly distributed (15 fish per tank) into 15 experimental tanks (300 L) connected to  
92 recirculating aquaculture systems equipped with biofilters and a diffusion aeration system.

93 Water temperature, salinity and photoperiod were kept as described for the acclimation  
94 period. They were daily monitored. Temperature ( $23.3 \pm 1.3^\circ\text{C}$ , average  $\pm$  standard deviation),  
95 salinity ( $5 \pm 0$  psu, average  $\pm$  standard deviation) and pH ( $8.0 \pm 0.2$ , average  $\pm$  standard  
96 deviation) were measured using a laboratory alcohol thermometer, a hand refractometer  
97 (S/Mill-E, Atago, Japan) and a pH meter (model HI223, Hanna, USA), respectively.

98 Dissolved oxygen ( $6.1 \pm 0.7$  ppm, average  $\pm$  standard deviation) and total ammonia ( $0.27 \pm$   
99  $0.01$  ppm nitrogen, average  $\pm$  standard deviation) were measured once a week following the  
100 methods described by Winkler (1888) and Solorzano (1969), respectively.

101 Five diets were tested in triplicate: 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0% dry weight salt (NaCl)  
102 supplementation from a basal diet (NRD 2/5, INVE, USA). Experimental diets were prepared  
103 following procedures previously described (Salman and Eddy, 1988). Briefly, the basal diet  
104 was grinded, NaCl dissolved in water was added, and the mixture was repelletized (5 mm  
105 diameter). The saltless diet (0.0 %) went through the same procedure, but no salt was added.  
106 Fish were fed twice a day until satiation for 40 days. Uneaten pellets were siphoned out after  
107 30 min of each meal. Every 10 days, each fish was removed from the tank, anaesthetized with  
108 clove oil (20 ppm) and weighed (wet weight).

109 At the end of experiment (40 days), 10 fish of each treatment were collected,  
110 euthanized with clove oil, and killed on ice. Samples of the second gill arch from both sides  
111 were collected. The left side arch was fixed in 10% buffered formalin for histological  
112 evaluation and the right side arch was immediately frozen in liquid nitrogen and then stored in  
113 ultrafreezer ( $-80^\circ\text{C}$ ) until the NKA activity determination, as further described. Skinless  
114 muscle was collected and stored at  $-2^\circ\text{C}$  for further proximate analysis, as described below.

115

## 116 *2.3 Gill NKA activity measurement*

117

118 Gill NKA activity was measured following the protocol described by Martins et al.  
119 (2011) adapted from McCormick (1993). Briefly, gills were homogenized in buffer  
120 containing sucrose, EDTA and imidazol. Homogenates were centrifuged at 10,000xg  
121 (Mikro22R, Hettich, Germany) for 1 min at 4°C. In this assay, ouabain-sensitive ATPase  
122 activity was measured by coupling the production of ADP to NADH using lactic  
123 dehydrogenase and pyruvate kinase in the presense and absence of 1 mM ouabain. The  
124 supernatant (10µl) was tested in duplicate in 96-well microplates at 25°C. Absorbance was  
125 read(340 nm) for 10min in a microplate reader (VICTOR™ 2, Perkin Elmer, USA). Total  
126 protein content in homogenates was measured using a Biuret protein assay kit (Doles Ltda,  
127 Brazil). Enzyme activity was expressed as  $\mu\text{mol ADP} \times \text{mg}^{-1} \text{ protein} \times \text{h}^{-1}$ .

128

#### 129 *2.4 Chemical analysis*

130

131 Sodium content in experimental diets was analyzed by atomic absorption  
132 spectrophotometry (AAS, Avanta 932 Plus – GBC, Hampshire, IL, USA). Diets were  
133 weighed, dried, and completely digested in 1ml of 65% HNO<sub>3</sub> (Suprapur®, Merck, Haar,  
134 Germany) at 60°C for 2 days. Digested samples were centrifuged (10 min; 4°C; 10,000xg;  
135 Mikro22R, Hettich, Germany) and the supernatant was collected for sodium measurements.

136 Proximate analyses (dry matter, crude protein, lipid and ash) were conducted in diet  
137 and fish muscle samples using standard procedures (AOAC, 2000). Dry matter was obtained  
138 by keeping samples at 105°C for 5 h. Ash content was determined after sample incineration at  
139 550°C in a muffle furnace for at least 6 h until constant weight was achieved. Lipid content  
140 was determined by the ether extraction procedure using a Soxhlet extractor. Crude protein  
141 content was determined using the Kjeldahl method.

142

#### 143 *2.5 Histological analysis*

144

145 The fixed gill samples were dehydrated in a graded series of ethanol, embedded in  
146 paraplast, and sectioned (5 µm). Tissue slices were stained with hematoxylin and eosin.  
147 Histological sections were analyzed as described by Weibel et al. (1966) and modified by  
148 Romano et al. (1996). Chloride cell density (cell number  $\times \text{mm}^{-2}$ ) was analyzed using an  
149 integration eyepiece reticule of 5 lines (Carl Zeiss) giving 25 points. Frequency measurements  
150 were obtained randomly from 10 histological fields of 40× of branchial tissue using light

151 microscopy (Olympus BH-2 microscope). Images were obtained by photomicroscopy  
 152 (Olympus BX51 with a digital camera Olympus DP72 ).

153

## 154 *2.6 Growth and feed parameters*

155

156 The following formulae were used to assess growth and feed utilization parameters:

157  $\text{Weight gain (\%)} = 100 \times (\text{final weight} - \text{initial weight}) \times (\text{initial weight})^{-1}$

158  $\text{Specific growth rate (SGR) (\% day}^{-1}\text{)} = 100 \times [\text{Ln}(\text{final weight}) - \text{Ln}(\text{initial weight})] \times$   
 159  $(\text{experimental days})^{-1}$

160  $\text{Mean fish mass} = (\text{final fish wet weight} \times \text{final fish number} + \text{initial fish wet weight} \times \text{initial}$   
 161  $\text{fish number}) \times 2^{-1}$

162  $\text{Feed intake} = 100 \times (\text{mean dry feed fed daily} \times \text{mean fish mass}^{-1})$

163  $\text{Feed conversion ratio (FCR)} = (\text{dry feed fed}) \times (\text{wet weight gain})^{-1}$

164  $\text{Protein efficiency ratio (PER)} = (\text{final weight} - \text{initial weight}) \times (\text{mass of protein fed})^{-1}$

165

## 166 *2.7 Statistical analyses*

167

168 All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Differences in mean weight,  
 169 weight gain (%), SGR, feed intake, FCR, PER, NKA activity, and number of chloride cells  
 170 among treatments were determined through one-way Analysis of Variance followed by  
 171 Duncan's multiple-range test for significant differences between means. Normality was  
 172 verified by the Kolmogorov-Smirnov test, and homogeneity of variance using the Levene's  
 173 test. Significance level for all analysis was established at 95%.

174

## 175 **3. Results**

176

177 Proximate analysis of the experimental diets is shown in Table 1. As expected, dietary  
 178 ash and salt (sodium) content was significantly different among treatments, increasing as the  
 179 level of salt supplementation increased. As opposed, dietary dry matter, protein and lipid  
 180 content significantly decreased as the salt supplementation increased.

181 In all treatments, no fish mortality was observed during the experimental period. After  
 182 40 days, the final weight of fish fed on salty diet was not significantly different from those fed  
 183 with control diet. Also, no significant differences in weight gain (%), SGR and PER were

184 observed among treatments. However, significant differences were found in feed intake and  
185 FCR, which increased with increasing the level of dietary salt (Table 2).

186 Cobia muscle did not show significant differences in protein, lipid and dry matter  
187 content among treatments after the 40-days period of feeding trial (Table 1).

188 Gill NKA activity in juvenile cobia fed with basal diet was significantly higher than in  
189 those fed on intermediary salty diet (Fig. 1). No significant differences were observed in NKA  
190 activity between control fishes and those fed on 10% NaCl supplementation diet (Fig. 1).

191 There was a significant increase in the number of chloride cells according to the level  
192 of dietary salt. It was more than two-fold higher in fish fed on 10% NaCl supplementation  
193 ( $41.2 \pm 11.0 \text{ cell mm}^{-2}$ ) than in those from the control group ( $16.3 \pm 7.8 \text{ cell mm}^{-2}$ ) (Fig. 2).  
194 Chloride cells were located mainly on the gill primary filament. However, in many cases,  
195 especially in cobia fed on the highest dietary salt levels, chloride cells were located on the  
196 secondary lamellar epithelium (Fig. 3).

197

#### 198 **4. Discussion**

199

200 As expected, proximate composition of the experimental diets employed in the present  
201 study to rear juvenile cobia in low-water salinity significantly changed among treatments. In  
202 the present trial, salt addition to the diet decreased the dietary protein and lipid content. This  
203 can be explained considering the dilution effect caused by the salt supplementation  
204 (ingredient dilution). The increased dietary ash and salt content can be ascribed to the NaCl  
205 addition to the diet by itself. It is important to note that other previous studies on dietary salt  
206 supplementation in fish also employed the protocol used in the present study (Staurnes and  
207 Finstad, 2000; Fontáinhas-Fernandez et al., 2001; Appelbaum and Arockiaraj, 2009). They  
208 also reported that dietary salt supplementation is a common practice in aquaculture industry  
209 since two decades ago, especially in freshwater and diadromous species culture (Salman and  
210 Eddy, 1988; Gangadhara et al., 2004). However, little attention is given to this topic, in spite  
211 of the fact that salt supplementation at certain levels enhance fish growth and reduces  
212 fisheries-derived ingredients, such as fish meal and oil. Although this reduction is small, it  
213 remains a significant contribution to the sustainable aquaculture activity. Also, it is important  
214 to stress that increasing  $\text{Na}^+$  concentration in the digestive tract of teleost fish might lead to a  
215 better absorption of end products such as carbohydrates and amino acids, since there are  $\text{Na}^+$   
216 dependent symporters involved in this process (Rust, 2002; Harpaz et al., 2005).

217 Salt supplementation on diet improved protein and lipids levels on muscle of rainbow  
218 trout *Oncorhynchus mykiss* (Ogino and Kamizono, 1975), rohu *Labeo rohita* (Gangadhara et  
219 al., 2004) and common carp *Cyprinus carpio* (Tacon et al., 1984). The present results showed  
220 that salty diet did not affect these parameters on cobia muscle.

221 Despite a reduction in the dietary protein content was observed after salt  
222 supplementation, it did not reach a critical level, being higher than that recommended for  
223 juvenile cobia (Chou et al., 2001). Nevertheless, feed intake at the higher levels of dietary salt  
224 was increased to compensate the lower protein content of these diets. This response resulted  
225 in a higher FCR, but PER was not hampered, suggesting that the protein supply was adequate  
226 for juvenile cobia.

227 The overall growth performance and survival of juvenile cobia observed in the present  
228 study can be considered satisfactory when compared to previous results reported for fish  
229 reared in brackish water. Results from the present study suggest that cobia can survive and  
230 growth for at least 50 days (considering the 10-days acclimation period), to salinity 5 psu. In  
231 this context, it is important to note that data reported for juvenile cobia reared in low-salinity  
232 water are controversy. For example, Denson et al. (2003) and Chen et al. (2009) reported that  
233 juvenile cobia reared in salinity 5 psu showed lower growth rate when compared to those kept  
234 at higher salinities. Similar findings were also reported for other marine fish species like the  
235 Brazilian flounder *Paralichthys orbignianus* (Sampaio and Bianchini, 2002), the gilthead sea  
236 bream *Sparus aurata* (Laiz-Carrión et al., 2005), and the shi drum *Umbrina cirrosa* (Mylonas  
237 et al., 2009). On the other hand, Resley et al. (2006) reported that the growth rate of juvenile  
238 cobia reared at salinity 5 psu was equivalent or better than that of fish reared at salinities 15  
239 and 30 psu. A similar response was observed for the flathead grey mullet *Mugil cephalus*  
240 (Cardona, 2000), and the Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* (Peterson et al., 1999).  
241 These controversy results could be explained considering the quality of food and laboratory  
242 conditions employed in the different studies. For example, Resley et al (2006) used diet  
243 prepared in laboratory while Denson et al. (2003) and Chen et al. (2009) employed  
244 commercial diet and squid, respectively.

245 Data from the present study on final weight, weight gain (%), and SGR for juvenile  
246 cobia showed that dietary salt supplementation did not improve growth of fish reared in low-  
247 salinity water. In rainbow trout *O. mykiss*, it was observed a significant negative linear  
248 relationship between dietary salt level and SGR (Salman and Eddy, 1988). This negative  
249 relationship was assigned to nutrient dilution caused by the NaCl supplementation on diets.  
250 On the other hand, dietary salt supplementation was shown to enhance growth rates in other



251 teleost fish such as the tilapia *Oreochromis niloticus* (Fontainhas-Fernandes et al., 2002), the  
252 rohu *L. rohita* (Gangadhara et al., 2004), the asian sea bass *Lates calcarifer* (Harpaz et al.,  
253 2005) and the gilthead sea bream *Sparus aurata* (Appelbaum and Arockiaraj, 2009). Also,  
254 juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* reared in freshwater, brackish water and seawater fed  
255 on salty diet showed different performances (Gatlin et al., 1992). When they were reared in  
256 freshwater, salty diet improved feed efficiency and growth. However, salty diet had no  
257 significant effect on growth of juvenile red drum reared in brackish water or seawater. Gatlin  
258 et al. (1992) suggested that the overall amount of salt available in seawater and brackish water  
259 would be enough to achieve the physiological need of red drum juveniles. In this context,  
260 salts present in water at salinity 5 psu seems also to be enough to achieve the juvenile cobia  
261 physiological need. Therefore, effects of salty diet on fish growth performance would be  
262 negligible.

263         Some freshwater teleost fish show a positive relationship between gill NKA activity  
264 and dietary salt level (Zaugg et al., 1983; Salman and Eddy, 1987; Fontainhas-Fernandes et  
265 al., 2001). In contrast, NKA activity decreased when juvenile cobia were fed diets  
266 supplemented with intermediate salt content. However, recrudescence of NKA activity was  
267 observed when higher levels of dietary salt were used. Cobia reared in low-salinity water lives  
268 in a hyposmotic environment (isosmotic point for cobia is equivalent to salinity 11.2; Burkey  
269 et al., 2007). Therefore, it faces a diffusive loss of electrolytes from the plasma towards the  
270 external medium. In order to counteract the ions loss, fish from the control group relied on a  
271 higher NKA activity to actively absorb more Na<sup>+</sup> from the external medium to the plasma.  
272 When intermediate levels of dietary salt were used (2.5 and 5%), cobia would have increase  
273 ion uptake in the gastrointestinal tract requiring a lower energy expenditure in the gills to  
274 keep sodium homeostasis. Juvenile black sea bream, a marine teleost, showed a decreased  
275 NKA activity when fed on a 5% ration size compared those fed a 10% ration size (Kelly et al.,  
276 1999). Indirectly, when more food is available, more salt is also available, and as observed for  
277 cobia fed on salty diet, NKA activity was reduced, may be sparing some energy that could be  
278 used to increase growth.

279         In addition to the biochemical changes in NKA activity, histological alterations on gill,  
280 such as gill phenotypes and number of chloride cells (CC), are also usually evaluated in many  
281 studies dealing with osmotic adaptation. One of them suggested that gill remodeling may  
282 involve sensing of elevated levels of internal salt (Perry et al., 2006). Accordingly, CC were  
283 more abundant in cobia fed on salty diet. This increased number of CC observed supports the  
284 idea that an elevated plasma NaCl concentration induced by a higher gastrointestinal uptake

285 from food exceeded the normal capacity of salt diffusion loss, mainly across the gills  
286 (Staurnes and Finstad, 2000). CC proliferation enhances  $\text{Cl}^-$  secretion, and facilitates the  
287 passive paracellular extrusion of  $\text{Na}^+$  on a favorable electrical gradient (McCormick et al.,  
288 2009). In extreme cases, a proliferation of CC number might concurrently impair gas transfer  
289 owing to a thickening of the lamellar blood-to-water diffusion barrier (Perry, 1997).

290 Taken altogether, findings reported in the present study showed that cobia  
291 osmoregulation costs seems to be reduced at intermediate levels of dietary NaCl (2.5 and 5%)  
292 supplementation, as shown by the reduced NKA activity observed. This finding suggests that  
293 elevated levels of internal salt may simulate seawater environment since juvenile cobia  
294 exhibited a hyposmoregulatory feature. Despite the apparent reduction in the energy cost for  
295 osmoregulation, dietary salt supplementation did not improve growth of juvenile cobia reared  
296 in low-salinity water. Furthermore, dietary salt supplementation of 7.5% or higher induced an  
297 increased feed intake and a hampered food conversion.

298 A recent work of Cnaami et al. (2010) raised some views about aquaculture trends  
299 following a “green-revolution” highlighting the importance of studies related to dietary salt.  
300 First, there is an increasing trend for intensive aquaculture methods, where natural food, rich  
301 in salt, is not present. Second, the use of recirculating aquaculture systems, where salt may be  
302 a limiting factor in freshwater or low salinity media. Moreover, for achieving the true  
303 sustainability, industry is motivated to reduce or eliminate fishmeal protein in aquafeeds and  
304 replace it by various plant-derived meals on diet, which are not as rich in salt. In light of this,  
305 findings reported in the present study will contribute for a better understanding of the impact  
306 of the dietary salt supplementation in marine fish aquaculture.

307

### 308 **Acknowledgements**

309

310 Authors thank the staff of LaNAM for their assistance during the experimental period.  
311 Camila M.G. Martins for the manuscript revision. This research was supported by the  
312 Brazilian CNPq (#483433/2007-1 and Edital MCT/CNPq/CT-Agronegócio/MPA 36/2009 #  
313 559741/2009-0). Renato Adriano dos Santos is a graduate student of the Aquaculture Program  
314 at FURG and is supported by Brazilian CNPq. Luís A. Sampaio and Adalto Bianchini are  
315 research fellows from the Brazilian CNPq.

316

317

318 **References**

319

320 A.O.A.C. 2000. Official Methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist.  
321 EUA.

322 Appelbaum, S., Arockiaraj, A.J., 2009. Salt incorporated diets for enhancing growth  
323 performance and survival in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. juveniles reared in low  
324 saline brackish water. *Sci. Mar. (Barc.)*, 73(S1): 213-217.

325 Atwood, H.L, Young, S.P., Tomasso, J.R., Smith, T.I.J., 2004. Resistance of cobia,  
326 *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high  
327 environmental nitrite concentrations. *J. Appl. Aquacult.*, 15: 191–195.

328 Bouef, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? –Review. *Comp.*  
329 *Biochem. Physiol.*, C 130, 411-423.

330 Burkey, K., Young, S.P., Smith, T.I.J., Tomasso, J.R., 2007. Low-salinity resistance of  
331 juvenile cobias. *N. Am. J. Aquaculture*. 69, 271-274.

332 Cardona, L., 2000. Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of  
333 mediterranean flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae). *Estuar.*  
334 *Coast. Shelf Sci.* 50, 727-737.

335 Chen, G, Wang, Z., Wu, Z., Gu, B., 2009. Effects of salinity on growth and energy budget of  
336 juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *J. World Aquacult. Soc.* 40, 374-382.

337 Chou, R-L., Su, M.S., Chen, H.Y., 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile  
338 cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 193, 81-89.

339 Cnaani, A., Barki, A., Slosman, T., Scharcanski, A., Milstein, A., Harpaz, S., 2010. Dietary  
340 salt supplement increases the growth rate in freshwater cultured tilapia hybrids. *Aquacult.*  
341 *Res.* 41, 1545-1548.

342 Denson, M.R., Stuart, K.R., Smith, T.I.J., Weirich, C.R., Segars, A., 2003. Effects of salinity  
343 on growth, survival, and selected hematological parameters on juvenile cobia,  
344 *Rachycentron canadum*. *J. World Aquacult. Soc.*, 34, 496-504.

345 Ditty, J.G., Shaw, R.F., 1992. Larval development, distribution, and ecology of cobia,  
346 *Rachycentron canadum*, (Family: Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. *Fish.*  
347 *Bull.* 90, 668-677.

348 Fontáinhas-Fernandes, A., Russell-Pinto, F., Gomes, E., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J.,  
349 2001. The effect of dietary sodium chloride on some osmoregulatory parameters of the

- 350 teleost, *Oreochromis niloticus*, after transfer from freshwater to seawater. Fish Physiol.  
351 Biochem. 23, 307-316.
- 352 Fontáinhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2002. Effect of  
353 supplemental dietary sodium chloride on growth rate of tilapia *Oreochromis niloticus*  
354 reared in variable salinities. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 54(2),204-211.
- 355 Gangadhara, B., Nandeesh, M.C., Keshavanath, P., Varghese, T.J., 2004. Growth response  
356 and biochemical composition of rohu, *Labeo rohita*, fed salt-incorporated diets. J. Appl.  
357 Aquaculture. 16(1), 169-176.
- 358 Gatlin, D.M., MacKenzie, D.S., Craig, S.R., Neill, W.H., 1992. Effects of dietary sodium  
359 chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. Prog. Fish-Cult. 54, 220-  
360 227.
- 361 Harpaz, S., Hakima, Y., Slosmana, T., Eroldogan, O.T., 2005. Effects of adding salt to the  
362 diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on  
363 growth and brush border enzyme activity. Aquaculture. 248, 315-324.
- 364 Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of  
365 chloride cells. Comp. Biochem. Physiol., B 136, 593-620.
- 366 Kelly, S.P., Chow, I.N.K., Woo, N.Y.S., 1999. Alterations in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and  
367 gill chloride cell morphometrics of juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*) in  
368 response to salinity and ration size. Aquaculture. 172, 351-367.
- 369 Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Soengas,  
370 J.L., Mancera, J.M., 2005. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in  
371 different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism.  
372 Aquaculture. 250, 849-861.
- 373 Liao, I.C., Huang, T.S., Tsai, W.S., Hsueh, C.M., Chang, S.L., Leño, E.M., 2004. Cobia  
374 culture in Taiwan: current status and problems. Aquaculture. 237, 155-165.
- 375 Martins, C.M.G., Almeida, D.V., Marins, L.F.F., Bianchini, A., 2011. mRNA expression and  
376 activity of ion-transporting proteins in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: effects  
377 of waterborne copper. Environ. Toxicol. Chem. 30(1), 206-211.
- 378 McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. Amer. Zool. 41,  
379 781-794.
- 380 McCormick, S.D., Regish, A.M., Christensen, A.K., 2009. Distinct freshwater and seawater  
381 isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. J. Exp. Biol. 212,  
382 3994-4001.

- 383 Mylonas, C.C., Pavlidis, M., Papandroulakis, N., Zaiss, M.M., Tsafarakis, D., Papadakis, I.E.,  
384 Varsamos, S., 2009. Growth performance and osmoregulation in the shi drum (*Umbrina*  
385 *cirrosa*) adapted to different environmental salinities. *Aquaculture*. 287, 203-210.
- 386 Ogino, C., Kamizono, M. 1975. Mineral requirements in fish. 1. Effects of dietary salt mixture  
387 level on growth, mortality and body composition in rainbow trout and carp. *Bull. Jap.*  
388 *Soc. Sci. Fish.* 41, 429-434.
- 389 Perry, S.F., 1997. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes.  
390 *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- 391 Perry, S.F., Rivero-Lopez, L., McNeill, B., Wilson, J., 2006. Fooling a freshwater fish: how  
392 dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *J. Exp. Biol.*  
393 209, 4591-4596.
- 394 Peterson, M.S., Comyns, B.H., Rakocinski, C.F., Fulling, G.L., 1999. Does salinity affect  
395 somatic growth in early juvenile Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (L.)? *J. Exp.*  
396 *Mar. Biol. Ecol.* 238, 199-207.
- 397 Resley, M.J., Webb, K.A., Holt, G.J., 2006. Growth and survival of juvenile cobia,  
398 *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system.  
399 *Aquaculture*. 253, 398-407.
- 400 Romano, L.A., Ferder, M.D, Stella, I.Y., Inserra, F., Ferder, L.F., 1996. High correlation in  
401 renal tissue between computed image analysis and classical morphometric analysis. *J.*  
402 *Histotechnol.* 19(2), 121-123.
- 403 Rust, M.B., 2002. Nutritional physiology. In: Halver, J., Hardy, R. (Eds.). *Fish nutrition*. 3<sup>rd</sup>  
404 edition. Academic Press. Amsterdam, pp. 367-452.
- 405 Salman, N.A., Eddy, F.B. 1987. Response of chloride cell numbers and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  
406 activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding.  
407 *Aquaculture*. 61, 41-48.
- 408 Salman, N.A., Eddy, F.B., 1988. Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake and  
409 conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*. 70,  
410 131-144.
- 411 Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the  
412 euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269(2), 187-196.
- 413 Schaffer, R.V., Nakamura, E.L., 1989. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron*  
414 *canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82. FAO Fish.  
415 *Synop.* 153.

- 416 Schmidt-Nielsen, K., 1997. Animal Physiology Adaptation and Environment, 5<sup>th</sup> ed.  
417 Cambridge Univ. Press, London.
- 418 Solarzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite  
419 method. Limnol. Oceanogr. 14, 799-801.
- 420 Staurnes, M., Finstad, B., 2000. The effects of dietary NaCl supplement on hypo-  
421 osmorregulatory ability and sea water performance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)  
422 smolts. Aquacult. Res. 31, 737-743.
- 423 Tacon, A.G.J., Knox, D., Cowey, C.B., 1984. Effect of different dietary levels of salt mixtures  
424 on growth and body composition in carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50, 1217-1222.
- 425 Weiber, E.R., Kistler, G.S., Scherle, W.F., 1966. Practical stereological methods for  
426 morphometric cytology. J. Cell Biol. 30, 23-38.
- 427 Winkler, L., 1888. Die Bestimmung des in Wasser Gelösten Sauerstoffes. Ber. Deutsch.  
428 Chem. Ges. 21, 2843-2855.
- 429 Woo, N.Y.S., Kelly, S.P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and  
430 metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. Aquaculture. 135, 229-238.
- 431 Zaugg, W.S., Roley, D.D., Prentice, E.F., Gores, K.X., Wakitz, F.W., 1983. Increased  
432 seawater survival and contribution to the fishery of chinook salmon (*Oncorhynchus*  
433 *tshawytscha*) by supplemental dietary salt. Aquaculture. 32, 183-188.
- 434

435 Table 1. Proximate analysis for experimental diets and muscle of juvenile cobia reared at  
 436 salinity 5 fed on diets supplemented with different levels of NaCl. Data are mean  $\pm$  standard  
 437 deviation. Data are expressed in g 100g<sup>-1</sup> wet weight, except for sodium content (mg g<sup>-1</sup>).  
 438

	Dietary treatments (% of salt supplementation)				
	0.0	2.5	5.0	7.5	10
<i>Diet</i>					
Dry matter	95.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	94.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	94.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	94.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	93.8 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>
Protein	53.4 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	52.1 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	50.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	49.3 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	47.8 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>
Lipid	11.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	9.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	9.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
Ash	11.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	14.2 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	16.2 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	18.0 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	19.8 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>
Sodium	7.9 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	41.9 $\pm$ 7.9 <sup>c</sup>	92.7 $\pm$ 13.9 <sup>d</sup>	182.2 $\pm$ 22.6 <sup>e</sup>
<i>Muscle</i>					
Dry matter	27.4 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	26.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	27.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	27.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
Protein	20.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	19.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
Lipid	5.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Ash	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

439 Different letters in each line indicate significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ) after  
 440 one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple-range test.

441

442 Table 2. Growth, feed utilization and other zootechnical parameters of juvenile cobia reared at  
 443 salinity 5 and fed on diets supplemented with different levels of NaCl. Data are means  $\pm$   
 444 standard deviation.

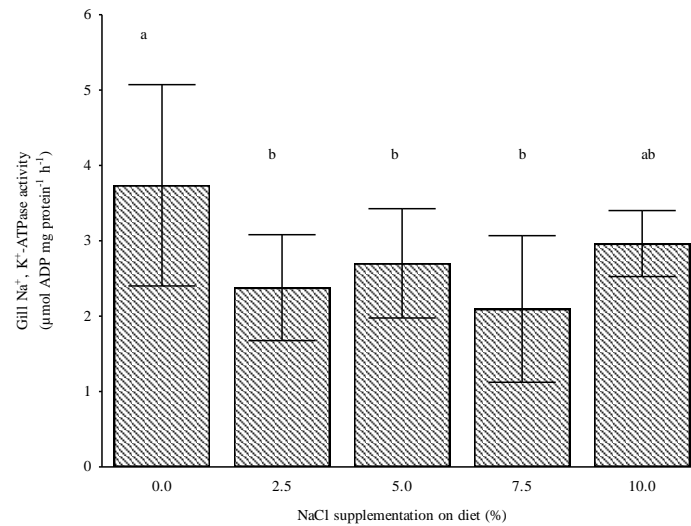
445

	Dietary treatments				
	0.0%	2.5%	5.0%	7.5%	10.0%
Initial weight (g)	12.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	11.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
Final weight (g)	56.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	58.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	57.9 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	57.3 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	57.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
Weight Gain (%)	370.8 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	391.9 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>	378.9 $\pm$ 22.7 <sup>a</sup>	382.7 $\pm$ 35.7 <sup>a</sup>	373.8 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>
SGR (% day <sup>-1</sup> )	3.87 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.98 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.91 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.93 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	3.89 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Feed intake (% day <sup>-1</sup> )	2.90 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.11 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	3.16 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	3.19 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	3.36 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
FCR	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.95 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	1.01 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
PER	2.09 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.09 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.09 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

446 Different letters in each line indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments after  
 447 one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple-range test.

448

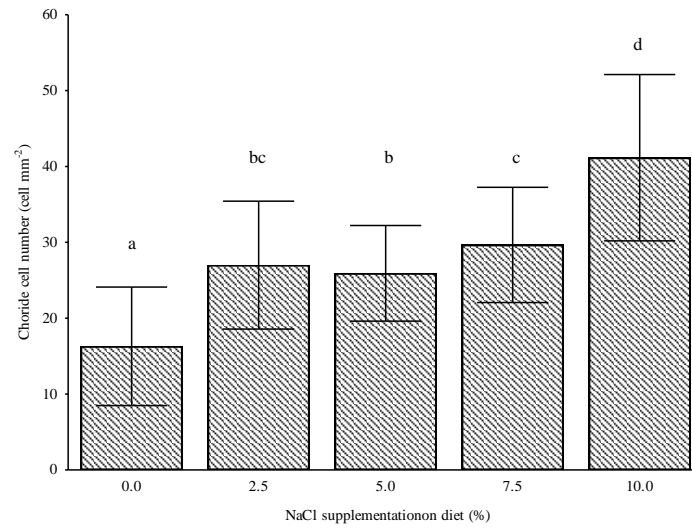




449

450 Figure 1. Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of juvenile cobia reared at salinity 5 for 40 days and  
 451 fed on diets supplemented with different levels of NaCl. Data are means ± standard deviation.  
 452 Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments after one-way  
 453 ANOVA followed by the Duncan's multiple-range test.

454



455

456 Figure 2. Chloride cell density in gills of juvenile cobia reared at salinity 5 and fed on  
457 different dietary NaCl levels for 40 days. Data are means  $\pm$  standard deviation. Different  
458 letters indicate significant differences ( $P < 0.001$ ) among treatments after one-way ANOVA  
459 followed by the Duncan's multiple-range test.

460

461 Figure 3. Histological sections of gill filaments (consisting of primary filament and secondary  
462 lamellae) showing structural changes in the epithelium of juvenile cobia *Rachycentron*  
463 *canadum* reared at salinity 5 and fed on different dietary levels of NaCl for 40 days. Upper  
464 slide: Gill filament of juvenile cobia kept under control conditions. Lower slide: Gill filament  
465 of juvenile cobia fed on diet containing 10% NaCl supplementation. \* indicate the chloride  
466 cells. (40 × magnification; scale bars: 50 μm).

467

468

469 Table 1. Experimental diets and muscle proximate analysis in g 100g<sup>-1</sup> wet weight of juvenile  
 470 cobia reared at salinity 5 fed with diets supplemented with NaCl.

	Dietary treatments				
	0.0	2.5	5.0	7.5	10
<i>Diet</i>					
Dry matter	95.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	94.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	94.4 ± 0.1 <sup>bc</sup>	94.3 ± 0.3 <sup>bd</sup>	93.8 ± 0.0 <sup>e</sup>
Protein	53.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	52.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	50.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	49.3 ± 0.4 <sup>d</sup>	47.8 ± 0.2 <sup>e</sup>
Lipid	11.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	9.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.8 <sup>b</sup>
Ash	11.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	14.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	16.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	18.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	19.8 ± 0.1 <sup>e</sup>
Sodium (mg g <sup>-1</sup> )	7.9 ± 2.5	13.5 ± 3.4	41.9 ± 7.9	92.7 ± 13.9	182.2 ± 226.1
<i>Muscle</i>					
Dry matter	27.4 ± 2.8	26.3 ± 1.7	26.1 ± 1.2	27.0 ± 1.0	27.8 ± 1.6
Protein	20.6 ± 0.7	19.3 ± 0.9	19.5 ± 0.7	19.5 ± 0.8	20.2 ± 0.8
Lipid	5.7 ± 0.1	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.1	8.2 ± 0.9	6.0 ± 0.6
Ash	1.3 ± 0.1 <sup>abc</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>cb</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>

471 Different letters at each line indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA  
 472 followed by the Duncan's multiple-range test.

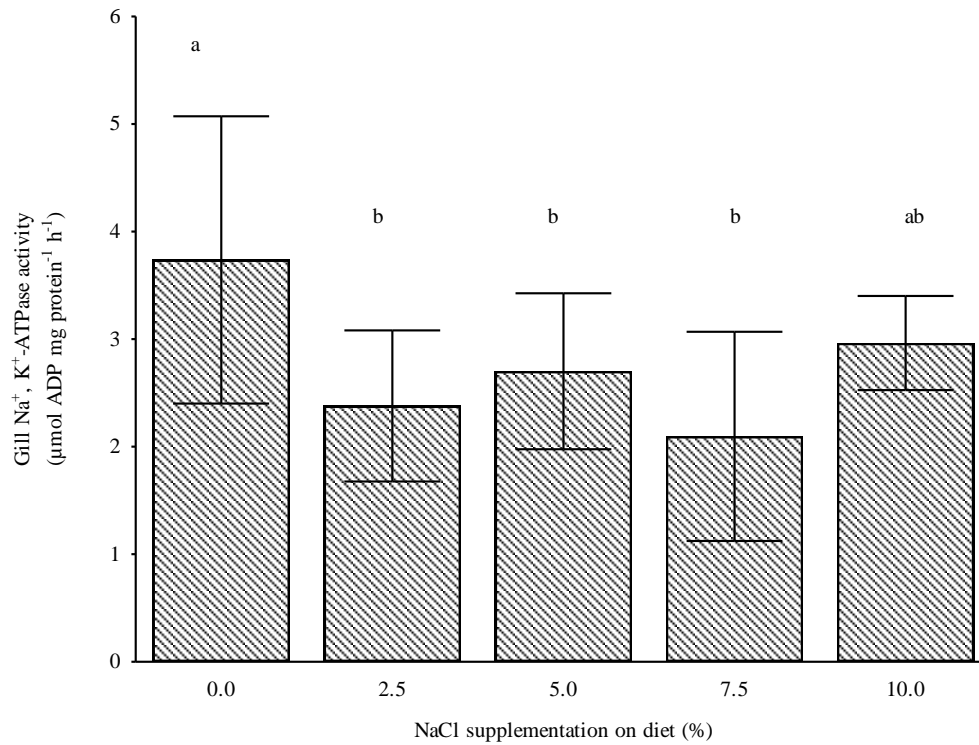
473

474 Table 2. Mean ( $\pm$  SD) of growth, feed utilization and other zootechnical parameters of  
 475 juvenile cobia reared at salinity 5 fed with diets supplemented with NaCl

	Dietary treatments				
	0.0%	2.5%	5.0%	7.5%	10.0%
Initial weight (g)	12.0 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 0.2	12.2 $\pm$ 0.5
Final weight (g)	56.5 $\pm$ 1.2	58.0 $\pm$ 0.9	57.9 $\pm$ 3.8	57.3 $\pm$ 3.0	57.9 $\pm$ 1.5
% Weight Gain	370.8 $\pm$ 6.3	391.9 $\pm$ 7.7	378.9 $\pm$ 22.7	382.7 $\pm$ 35.7	373.8 $\pm$ 6.8
SGR (% day <sup>-1</sup> )	3.87 $\pm$ 0.03	3.98 $\pm$ 0.04	3.91 $\pm$ 0.12	3.93 $\pm$ 0.18	3.89 $\pm$ 0.04
Feed intake (% day <sup>-1</sup> )	2.90 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.11 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	3.16 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	3.19 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	3.36 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
FCR	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.95 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	1.01 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
PER	2.09 $\pm$ 0.03	2.04 $\pm$ 0.05	2.09 $\pm$ 0.11	2.09 $\pm$ 0.03	2.06 $\pm$ 0.07

476 Different letters at each line indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA  
 477 followed by the Duncan's multiple-range test.

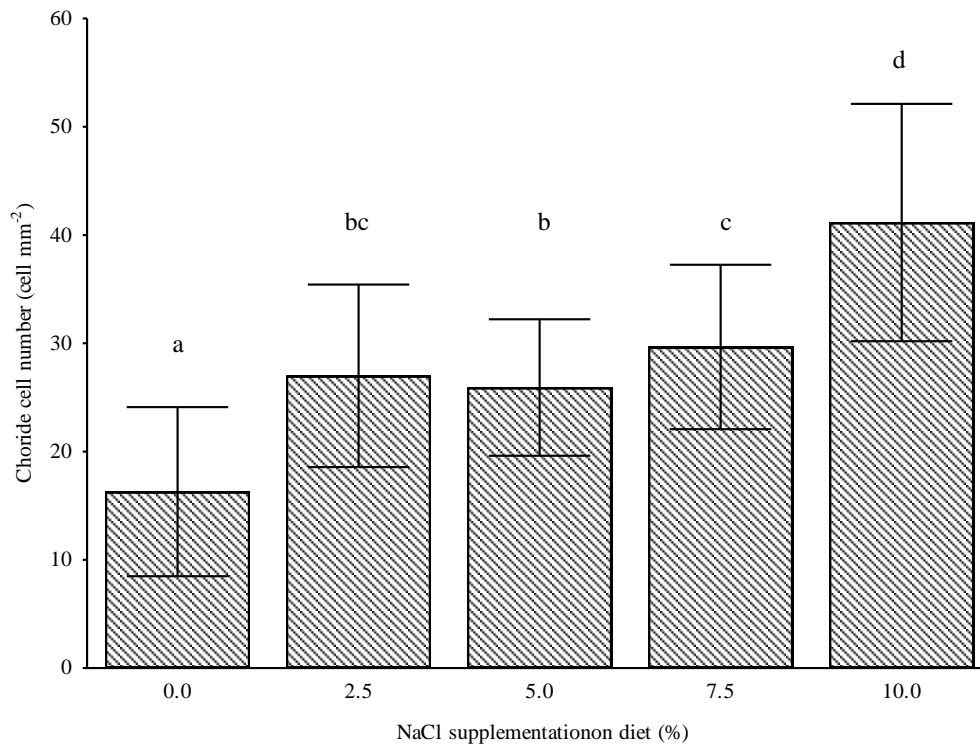
478



479

480 Figure 1 – Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of juvenile cobia reared at salinity 5 for 40 days fed  
481 with diets supplemented with NaCl. Values are means ± SD. Different letters indicate  
482 significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments after one-way ANOVA followed by the  
483 Duncan's multiple-range test.

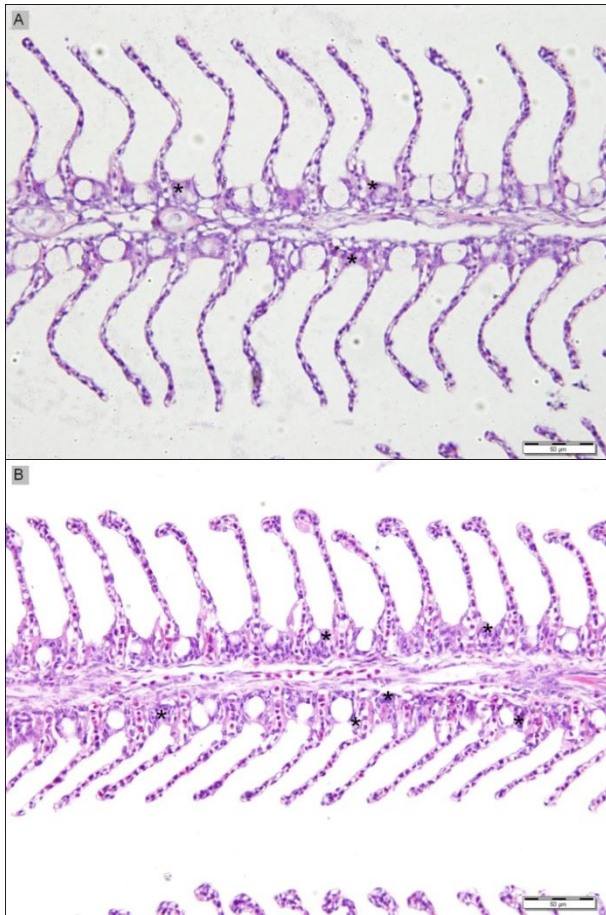
484



485

486 Figure 2 –Chloride cell density in gills of juvenile cobia reared at salinity 5 fed with different  
487 dietary NaCl levels during 40 days. Values are means  $\pm$  SD. Different letters indicate  
488 significant differences ( $P < 0.001$ ) among treatments after one-way ANOVA followed by the  
489 Duncan's multiple-range test.

490



491

492

493 Figure 3. Histological sections of gill filaments (consisting of primary filament and secondary  
 494 lamellae) showing structural changes in the epithelium of juvenile cobia *Rachycentron*  
 495 *canadum* reared at salinity 5 and fed on different dietary levels of NaCl for 40 days. A: Gill  
 496 filament of juvenile cobia kept under control conditions. B: Gill filament of juvenile cobia  
 497 fed on diet containing 10% NaCl supplementation. \* indicate the chloride cells. (40 ×  
 498 magnification; scale bars: 50 μm).

499



## 500 **Conclusões**

501

502 O presente trabalho permite concluir que a adição de NaCl em dietas ofertadas para  
503 juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* criados em salinidade 5 durante 40 dias não é  
504 necessária para melhorar o desempenho de crescimento e sobrevivência desse peixe. Apesar  
505 de não ter sido mensurado, a salinidade 5 pode conter a quantidade de íons  
506 (NaCl) fisiologicamente necessários à juvenis de bijupirá. Quando a dieta é suplementada em  
507 7,5 e 10% de NaCl, o bijupirá apresentou piores taxas de conversão alimentar, além de  
508 significativamente consumir mais alimento. Entretanto, a adição de NaCl em 2,5; 5 e 7,5%  
509 oferece menor gasto energético envolvido na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial, a principal  
510 enzima envolvida na osmorregulação. Adicionalmente, foi verificado que o aumento do teor  
511 de sal na dieta acarreta a proliferação das células de cloreto. Com base nos resultados da  
512 composição proximal muscular, foi verificado que a adição de NaCl na dieta não altera a  
513 qualidade protéica e lipídica do músculo de juvenis de bijupirá criados em salinidade 5.  
514