

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

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO
OSMORREGULATÓRIO DA TAINHA *Mugil*
liza: IMPLICAÇÕES PARA SUA PRODUÇÃO
EM CATIVEIRO**

VIVIANA LISBOA DA CUNHA

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

Orientador: ADALTO BIANCHINI

RIO GRANDE
Dezembro, 2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a pessoa que tive a bênção de ter como avó; “Tantas querida”.
(*in memonriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Adalto Bianchini, que no decorrer desses anos me tornou uma pessoa melhor.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e pela colaboração para o aprimoramento desta tese.

Agradeço ao curso de Pós Graduação em Oceanografia Biológica, por ter me dado a oportunidade de cursar o doutorado.

Ao CNPq, Capes e Ministério da Pesca e Aquicultura, por terem possibilitado a minha dedicação aos estudos.

Aos amigos do grupo de pesquisa Piscicultura Estuarina e Marinha, do Projeto Camarão e do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha que tenho o prazer de conviver.

A meus amigos-família, por serem os melhores que uma pessoa pode ter.

A todos os anjos que cruzaram o meu caminho e possibilitaram a minha caminhada durante este processo, especialmente a Vera Olvera, Indianara Barcaroli e ao professor Eduardo Secchi.

Agradeço a minha família, que mesmo distante se faz sempre presente.

Agradeço ao que, na sua forma particular de ser, se manteve sempre ao meu lado.

E, finalmente, para todos nós, deixo esta frase;

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana”.

(Carl G. Jung).

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	4
1.1. A Tainha <i>Mugil liza</i>	4
1.1.1. Identificação e caracterização da espécie	4
1.1.2. Distribuição.....	5
1.1.3. Ciclo de vida	6
1.2. A pesca da tainha na Região Sul do Brasil	7
1.3. A criação de <i>Mugil liza</i> em cativeiro	8
1.3.1. Reprodução	8
1.3.2. Larvicultura e produção de juvenis	10
1.3.3. Crescimento	12
1.4. Aspectos fisiológicos associados à Aquicultura	15
1.4.1. Metabolismo e crescimento	15
1.4.2. Reserva energética	16
1.4.3. Avaliação do metabolismo	16
1.4.4. A osmorregulação	18
1.4.5. Osmorregulação <i>versus</i> Aquicultura	28

1.5.	A pesca e a aquicultura	30
2.	OBJETIVOS	33
2.1.	Objetivo principal	33
2.2.	Objetivos específicos	33
3.	METODOLOGIA GERAL	35
3.1.	Local	35
3.2.	Origem dos animais	35
3.3.	Condições experimentais	36
3.4.	Parâmetros analisados	37
3.4.1.	Índices zootécnicos	38
3.4.2.	Osmolalidade plasmática	38
3.4.3.	Atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$	39
3.4.4.	Taxa de consumo de oxigênio corporal	40
3.4.5.	Conteúdo hepático de glicogênio	41
3.4.6.	Análise dos dados	42
CAPÍTULO I: A aclimação de juvenis de <i>Mugil liza</i> a salinidade ambiental		44
CAPÍTULO II: O efeito da salinidade na sobrevivência, crescimento e parâmetros bioquímicos em juvenis da tainha <i>Mugil liza</i>		46
CAPÍTULO III: O teor de sódio na dieta para juvenis de <i>Mugil liza</i> mantidos em água doce		48
CONCLUSÕES GERAIS		51

CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
BIBLIOGRAFIA	56
ANEXO I: Acclimation of juvenile lebranche mullet <i>Mugil liza</i> to environmental salinity.....	67
ANEXO II: Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch <i>Mugil liza</i>	93
ANEXO III: Dietary Salt Supplementation for Juvenile Lebranche Mullet <i>Mugil liza</i> Reared in Freshwater	118

RESUMO

A “Teoria isosmótica” postula que o ambiente isosmótico beneficia o crescimento de peixes teleósteo por minimizar o gasto energético com a osmorregulação. Entretanto, como a significância do gasto energético com osmorregulação, além de mudar durante o período de desenvolvimento, é espécie-específica, o objetivo desta tese foi verificar se a “Teoria Isosmótica” é aplicável para *Mugil liza*. No experimento I foi verificado que o ambiente isosmótico para a espécie ocorre na salinidade 13,5‰ e que a faixa de variação entre 5 e 40‰ de salinidade, ao final de 15 dias, não influenciou ($p>0,05$) a sobrevivência (100%), a osmolalidade plasmática ($417,6 \pm 18,0 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$) e a taxa de consumo de oxigênio ($0,39 \pm 0,03 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Que a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase branquial apresentou o padrão “U” como resposta, com maior atividade nas salinidades extremas (5‰ e 40‰), complementada pela resposta da reserva de glicogênio hepático, que apresentou menor concentração ($p<0,05$) nas salinidades extremas. No experimento II, após serem mantidos por 40 dias nas salinidades correspondentes a 0, 50, 100 e 200‰ do ponto isosmótico de teleósteos, especificamente o crescimento e a taxa de crescimento específica (G) foram prejudicados em água doce ($p<0,05$). O experimento III teve como objetivo então verificar se o menor crescimento dos indivíduos mantidos em água doce poderia ser compensado através da adição de sódio na ração. O melhor crescimento foi observado nos indivíduos alimentados com o teor de sódio igual a 5,4% e o efeito contrário foi observado nos teores acima deste nível (8,0 e 13,2%), entretanto o melhor teor de sódio estimado foi de 2,6%. Os resultados desta tese permitem concluir que *M. liza* tolera uma ampla faixa salinidade e, apesar de apresentar uma tendência de

23 menor gasto energético em torno da salinidade isosmótica, a quantidade de energia
24 poupada pelos indivíduos nesta faixa de desenvolvimento não foi significativa para
25 incrementar o crescimento. As evidências descritas no presente estudo apontam o
26 potencial de criação da tainha *M. liza* em ampla faixa de salinidade.

27

28

29

30

31

32 **ABSTRACT**

33 The “Isosmotic Theory” postulate that the isosmotic environment benefit teleosteo
34 growth by the osmoregulatory cost minimization. However, osmoregulatory cost
35 significance, besides change with the development period, is specie-specific, thus the
36 target of this thesis was verify f the “Isosmotic Theory” is applied for *Mugil liza*. The
37 experiment I determinate that the species isosmotic environment occur at 13,5‰
38 salinity and that the range variation between 5 and 40‰ of salinity, after 15 days, did
39 not influence ($p>0,05$) survivor (100%), plasmatic osmolality ($417,6 \pm 18,0$ mOsmol
40 Kg⁻¹) and the oxygen consumption rate ($0,39 \pm 0,03$ mg O₂ g⁻¹ h⁻¹). That the gill Na⁺,
41 K⁺-ATPase activity shows, with “U-shaped pattern”, higher activity at extremes
42 salinities (5‰ e 40‰), and that it was complemented by liver glycogen response, that
43 was lower ($p<0,05$) at extremes salinities (5‰ e 40‰). The experiment II, after 40 days
44 at salinities corresponded to 0, 50, 100 e 200‰ of teleosteo isosmotic point, specifically
45 only the growth and the specific growth rate (SGR) were damage in fresh water
46 ($p<0,05$). Then, the experiment III aimed to check whether the slower growth of
47 individuals kept in fresh water could be compensated by supplementation of diet with
48 salt. The better growth was achieved at 5,4% salt supplementation, however the best
49 estimated salt supplementation level was 2.6%. The results of this thesis shows that *M.*
50 *liza* tolerates a wide salinity range and, despite a trend of lower osmoregulatory energy
51 cost around the isosmotic salinity, the amount of energy saved by individuals in this life
52 development was not significant to improve growth. The evidence described in this
53 study confirms the potential of mullet *M. liza* rearing on a wide range of salinity.

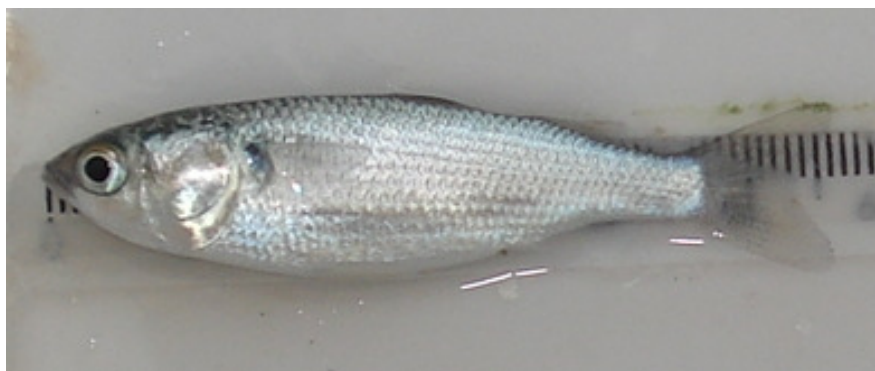
54 1. INTRODUÇÃO GERAL

55

56 1.1. A tainha *Mugil liza*

57 O status taxonômico da espécie identificada até então como *Mugil platanus* foi
58 revisado por Menezes et al. (2010) e foi constatado que a correta nomenclatura de *M.*
59 *platanus* é na verdade *Mugil liza* (Fig. 1).

60



61

62 Figura 1. Espécime de *Mugil liza* (Foto: Viviana Lisboa).

63

64 1.1.1. Identificação - caracterização da espécie

65 Classe Osteichthyes

66 Subclasse Actinopterygii

67 Infraclasse Teleostei

68 Superordem Acanthopterygii

69 Ordem Mugiliformes

70 Família Mugilidae

71 Gênero *Mugil*

72 Espécie *Mugil liza*

73

74 A tainha *M. liza* (Valenciennes, 1836) é caracterizada por apresentar o valor
75 total de 11 como resultado da soma de seus raios e espinhos da nadadeira anal, que
76 podem estar distribuídos em 3 espinhos e 8 raios ou 2 espinhos e 9 raios. Seu corpo
77 alongado e fusiforme possui estrias horizontais escuras facilmente identificadas,
78 enquanto seus olhos possuem uma pálpebra adiposa (Fig. 1). Trata-se de espécie de
79 hábito alimentar detritívoro – iliófago, com registro de exemplares de até 1 m e 8 kg, e
80 longevidade por volta de 15 anos (Menezes & Figueiredo 1980, Fischer et al. 2011). É
81 uma espécie ovípara com desova total de ovos pelágicos não adesivos, com diâmetro
82 médio de 0,46 mm, sendo r-estrategista com fecundidade variando de 0,5 a 2,4 milhões
83 de ovócitos para fêmeas de 40 a 65 cm (Menezes & Figueiredo 1980, Vieira 1991,
84 Miranda Filho et al. 2010, Fischer et al. 2011).

85

86 1.1.2. Distribuição

87 A tainha *M. liza* habita águas tropicais e subtropicais da Flórida até a Argentina
88 e especificamente no Rio Grande do Sul, a região estuarina e costa adjacente da Lagoa
89 dos Patos (Vieira 1991, Fischer et al. 2011) (Fig. 2). Esta espécie é classificada como
90 sendo estuarino dependente (Oliveira & Bemvenuti 2006).

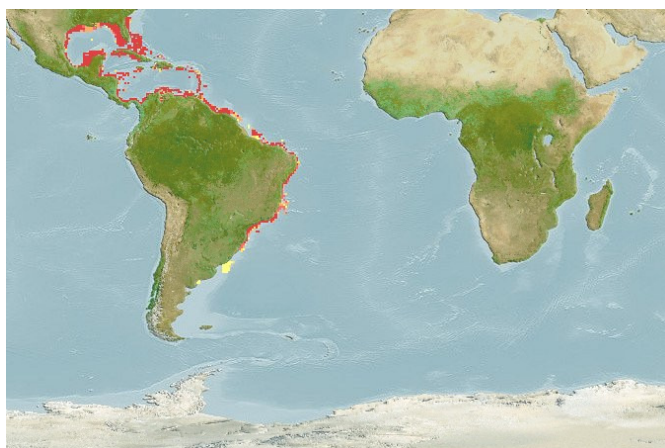


Figura 2. Mapa da distribuição da espécie *Mugil liza*. (Fonte: Fishbase)

1.1.3. Ciclo de vida

A migração reprodutiva dos indivíduos maduros da Lagoa dos Patos para o mar (espécie catádroma) está associada ao decréscimo da temperatura e aumento da salinidade característicos do período entre maio-junho (Fig. 3).

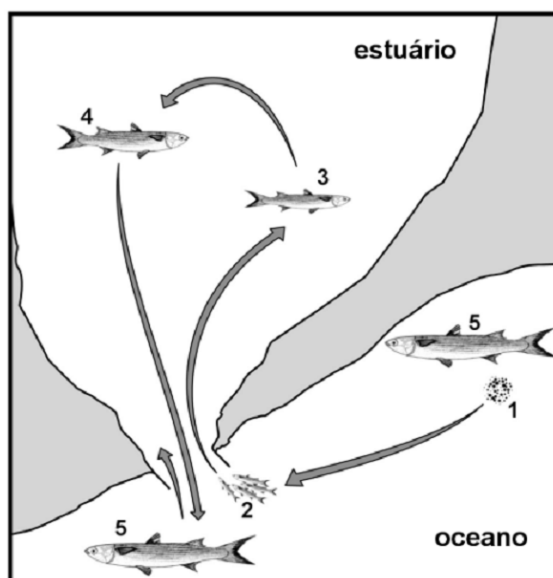


Figura 3. Ciclo de vida da tainha *Mugil liza* (Fonte: Oliveira e Bemvenuti, 2006).

100 Já a migração dos indivíduos jovens para o estuário da Lagoa dos Patos está
101 relacionada a transição do modo de vida pelágico para bentônico e lá permanecem até a
102 sua maturação sexual, que ocorre por volta dos dois anos de vida para os machos e três
103 anos de vida para as fêmeas (Vieira 1991, Miranda Filho et al. 2010).

104

105 1.2. A pesca da tainha na Região Sul do Brasil

106 A tainha é um recurso economicamente importante no Sul do Brasil,
107 principalmente para a pesca artesanal (Reis & D'Incao 2000) (Fig. 4).



108

109 Figura 4. Pesca artesanal da tainha *Mugil liza* no litoral de SC (Fonte: Jornal Ilha Capital)

110

111 O decréscimo da captura da sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e a
112 valorização da tainha e de sua ova no mercado desde o ano 2000 motivaram a
113 intensificação do esforço de pesca sobre este recurso, que passou a ser disputado entre a
114 pesca artesanal e industrial. Em 2004, a tainha ingressou na lista das espécies sobre-
115 exploradas ou ameaçadas de sobre-exploração (IN MMA nº5 05/2004), quando foi dado

um prazo de dez a 9 anos para organização e execução de um Plano de Gestão para sua pesca. Quatro anos depois foi instituída a instrução normativa do IBAMA nº171/2008, onde ficaram estabelecidas as normas para exploração deste recurso na região Sudeste e Sul. Até o momento, baseado nos dados de 2008, 2009 e 2010, o que se observa é uma estabilização da sua produção pela pesca extrativista marinha em torno de 4% do valor nacional total de pesca marinha (MPA 2008/2009). O Plano de Gestão para sua pesca ainda não foi estabelecido.

123

1.3. Criação da tainha *Mugil liza* em cativeiro

Do ponto de vista da aquicultura, *M. liza* é uma espécie rústica, de fácil manejo e adaptação ao cativeiro, que aceita fácil a dieta artificial e oferece mais oportunidade de criação devido a possibilidade de uso de diferentes fontes de água (Fonseca Neto & Spach 1998/1999).

Aliado a estas características, por ser uma espécie de baixo nível trófico, a alimentação em cativeiro pode ser realizada com uso de ração com baixo teor de proteína animal (Godinho et al. 1988, Carvalho et al. 2010), minimizando a questão do uso de elevadas quantidades de farinha de peixe característica para espécies carnívoras.

133

1.3.1. Reprodução

O protocolo para reprodução em cativeiro e obtenção de juvenis de *M. liza* ainda não está bem definido. Entretanto, vários estudos sobre sua biologia reprodutiva foram realizados e podem ajudar a estabelecer uma metodologia para sua reprodução em

138 cativeiro. Em seu habitat natural, o aumento da salinidade e a queda brusca da
139 temperatura são apontados como “gatilho” para sua migração reprodutiva,
140 popularmente conhecida como “corrida da tainha. Seu desenvolvimento gonadal foi
141 dividido em cinco etapas (Andrade-Talmelli et al. 1996).

142 Reprodutores de tainha não são mantidos rotineiramente em laboratório no
143 Brasil, pois há dificuldade em obter a vitelogênese completa em cativeiro. A desova é
144 obtida através de indução hormonal de indivíduos maduros capturados na natureza
145 (Figura 5).

146 Godinho et al. (1993) verificaram que fêmeas com oócitos com diâmetro médio
147 variando entre 586 e 625 μm apresentaram melhores resultados quando induzidas com
148 duas doses de HCG, sendo a primeira de 20.000 UI/Kg e a segunda de 40.000 UI/Kg. A
149 desova ocorre por volta de 54 h após a segunda aplicação do hormônio realizada num
150 intervalo de 24 h.



Figura. 5. Processo de extrusão em exemplar de *Mugil liza*. (Fonte: <http://ipesca.tripod.com/maricult.htm>)

151 A dose está acima da usualmente utilizada para outras espécies e isso ocorre
152 devido a tainha ser uma espécie com desova total.

153 O desenvolvimento de pesquisas para determinação do hormônio adequado,
154 dose e via de aplicação (injeção ou peletts) são importantes para otimizar a obtenção de
155 ovos de qualidade para fertilização artificial, visto que a criação comercial não deveria
156 depender de juvenis capturados na natureza como ocorre em outros países.

157

158 **1.3.2. Larvicultura e produção de juvenis**

159 A larvicultura da tainha (Figura 6) é feita em sistema de água verde com a
160 microalga (*Nannochloropsis oculata*) (Yamanaka et al. 1991) (Figura 7A). A primeira
161 alimentação das larvas (Figura 6) é realizada com rotíferos (*Brachionus plicatilis*)
162 (Figura 7B), que são oferecidos a partir do quarto dia de vida.

163 A substituição dos rotíferos por náuplios de *Artemia* sp. (Figura 7C) pode ser
164 realizada após o 24º dia da eclosão (Yamanaka et al. 1991).



Figura. 6. Larva de *Mugil* sp. (Fonte: <http://www.pesca.sp.gov.br/imagens.php?pag=5>)

165

Já Galvão et al. (1997) mantiveram a alimentação de larvas com rotíferos e *N. oculata* até o 40º dia, acrescentado náuplios de *Artemia* sp. do 20º ao 60º dia. Tanto o rotífero quanto a *Artemia* sp. podem ser ainda enriquecidos com ácidos graxos altamente insaturados melhorando assim valor nutricional e consequentemente aprimorando a qualidade da larva.

A baixa atividade enzimática durante a fase larval dificulta a utilização de ração desde as primeiras fases desenvolvimento (Galvão et al. 1997). A substituição do alimento vivo por dietas inertes pode ser realizada com a co-alimentação de ração e náuplios de *Artemia* sp. a partir do 24º após a eclosão (Godinho 2005). Já Galvão et al. (1997) realizaram esta transição a partir do 40º dia, oferecendo uma co-alimentação com dieta microparticulada de 400µm com 45% de proteína bruta.



Figura. 7. Itens alimentares utilizados na larvicultura de *Mugil liza*. **A.** Microalga *Nannochloropsis oculata*. **B.** Rotífero *Branchionus plicatilis*. **C.** Náuplio de *Artemia* sp. (Fonte: <http://www.sbae-industries.be/Technology/specs/Nannochloropsis.html>, <http://www.nikonsmallworld.com/gallery/year/2007/41>, http://www.reefcorner.org/forum/topic.asp?TOPIC_ID=133672)

185 A alimentação de pequenos juvenis (peso inicial de 136 mg) deve ser feita com
186 uma taxa de arraçoamento de 15% do peso para otimizar a conversão alimentar e a taxa
187 de crescimento (Sampaio et al. 1998).

188 Scorvo Filho et al. (1992) sugerem a densidade de estocagem de 5 indivíduos/m²
189 para juvenis com 22 mg. Já Sampaio et al. (2001) verificaram que para juvenis de 250
190 mg a densidade de 10 juvenis/L permite a produção de um número maior de indivíduos,
191 enquanto que densidade mais baixa (1 indivíduo/L) proporciona melhor qualidade de
192 água e maior sobrevivência.

193 A temperatura ideal para a criação de juvenis de tainha é de 30°C (Okamoto et
194 al. 2006). Apesar de ser uma espécie eurialina, Fonseca e Spach (1998/1999) afirmam
195 que antes da transferência para a água doce, os juvenis (indivíduos entre 28 e 33 mm)
196 devem ser aclimatados inicialmente à salinidade 5.

197 A manutenção da qualidade de água deve ser uma preocupação constante em
198 todas as fases de criação. Miranda et al. (1995) observaram que concentrações a partir
199 de 2 ppm de amônia total causam redução no crescimento de juvenis de tainha. Sampaio
200 et al. (2002) estudaram a toxicidade aguda da amônia e do nitrito e demonstraram que a
201 toxicidade aumenta em água doce quando comparado com juvenis aclimatados em
202 salinidade mais elevada.

203

204 **1.2.3. Crescimento**

205 O hábito alimentar de *M. liza* se diferencia de acordo com a fase de seu ciclo de
206 vida, passando de planctófago a iliófago (Oliveira & Soares 1996). Carvalho et al.

(2010) testaram diferentes níveis proteicos (entre 30 e 50% de proteína bruta) utilizando dietas semi-purificadas e estimou uma necessidade de 34% de proteína bruta para indivíduos pesando 1 g. Entretanto, em um ambiente com disponibilidade de alimento natural a necessidade proteica pode ser ainda menor. Em estudos realizados em viveiros para produção de camarão marinho, tainhas com peso inicial de 32 g foram alimentadas durante 51 dias com ração comercial contendo 28 e 48% de proteína. Os resultados obtidos não apresentaram diferença no ganho de peso e sobrevivência entre os dois tratamentos (dados não publicados).

Visto que em seu ambiente natural a tainha utiliza a produção primária como fonte de alimento, outra opção de alimento para sua produção é o uso da fertilização artificial. Esta é uma prática já amplamente utilizada (Garg & Bhatnagar 2000), bem como o uso de substratos para estimular a produtividade da cadeia autotófica e heterotófica e potencializar o rendimento dos peixes em viveiros. Estes sistemas maximizam o desenvolvimento de organismos que estão diretamente relacionados com a produtividade primária e têm sido aplicados com sucesso na Índia (Keshavanath et al. 2001, Azim et al. 2002).

A criação de tainha pode ser realizada nos sistemas de mono e/ou policultivo (Cafsi et al. 2003, Lupatsch et al. 2003, Costa et al. 2008) em lagos, reservatórios, viveiros ou tanque-rede. Dentre os países produtores se destacam: Egito, Coréia do Sul, Taiwan e Índia (FAO 2011) (Figura 8).

Tainhas com peso médio de 83 g foram estocadas em tanque-rede instaladas na Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS). Elas foram alimentadas com 5% do peso vivo por

229 dia com ração extrusada (45% de proteína bruta) e foi observada uma boa
230 sobrevivência, consumo do biofilme e a taxa de crescimento diária de 0,38%/dia
231 (Maçada et al. 2000). Este crescimento foi considerado lento, quando comparado com o
232 de tainha criada em viveiros estuarinos utilizados normalmente para a criação de
233 camarão, que atingiu 1,9%/dia (dados não publicados).

234



235

236 Figura. 8. Produto da engorda de *Mugil sp.* em sistema de gaiolas no sul da Índia.
237 (Fonte: <http://www.cmfri.org.in/news36.html>)

238

239 O policultivo é uma técnica que visa maior aproveitamento das fontes de
240 alimento e do espaço, buscando um aumento da produção por unidade de área de
241 cultivo, sendo esta prática considerada ambientalmente mais eficiente que o
242 monocultivo. A tainha e o camarão são espécies compatíveis, sendo a soma da
243 produtividade primária com o fornecimento de ração para o camarão um fator positivo,
244 fazendo dos viveiros de policultivo um ambiente favorável ao desenvolvimento da
245 tainha, sem haver prejuízo para o camarão. Costa et al. (2008) comprovaram a
246 viabilidade técnica do policultivo da tainha *M. liza* com o camarão *Litopenaeus*

247 *vannamei*, demonstrando que esta pode ser uma alternativa viável para o cultivo destas
 248 duas espécies.

249 A utilização de gaiolas ou cercados para os camarões dentro de viveiros com tainhas
 250 (Figura 9) também facilitaria a captura dos camarões no momento da despesca, visto
 251 que os camarões atingem o tamanho comercial mais que a tainha.

252



253 Figura 9. Cercados utilizados na engorda experimental da tainha *Mugil liza* em viveiro
 254 de camarão da fazenda CARCIBRAS (Foto: Danilo de Castro Faria).

255

256 **1.4. Aspectos fisiológicos associados à aquicultura**

257

258 **1.4.1. Metabolismo e crescimento**

259 A premissa para o funcionamento de um organismo é o seu suprimento de
 260 energia. Em peixes, assim como para outros vertebrados, esta energia provém da
 261 oxidação de compostos orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas) ricos em energia.
 262 A energia de compostos orgânicos é liberada na forma de calor e para ser utilizada pelo
 263 organismo, é “transformada” através do Ciclo de Krebs e cadeia respiratória em energia

264 química, a adenosina trifosfato ou ATP (Nelson & Cox 2007). Logo, o ATP pode ser
265 considerado a moeda da economia metabólica. O crescimento do organismo pode ser
266 considerado uma consequência do “lucro energético líquido”, ou seja, quando a
267 quantidade de energia obtida do alimento é suficiente para pagar o gasto energético com
268 manutenção dos processos vitais e a sobra, esta “energia líquida”, pode então ser
269 investida no processo de crescimento, o qual é definido por Morgan et al. (2000) como
270 sendo o incremento de proteínas devido a sua taxa de síntese ser maior que a sua taxa de
271 degradação.

272

273 **1.4.2. Reserva energética**

274 Quando a obtenção de energia metabólica é suficiente para manter o
275 metabolismo basal, promover o crescimento e ainda permitir uma “sobra” energética é
276 possível que essa energia extra seja armazenada no organismo sob a forma de
277 carboidrato de reserva, o glicogênio, e/ou na forma de gordura (Meurer et al. 2002). O
278 principal sítio de conversão de glicose em glicogênio (glicogenogênese) e o principal
279 local de reserva deste carboidrato é o fígado (Baldiasserotto 2009). Já a gordura é
280 acumulada principalmente no tecido adiposo, mas também no fígado e músculo (Van
281 Den Thillart & Van Raaij 1995). Apesar de, quando necessário, o organismo priorizar o
282 uso das reservas energéticas na forma de glicogênio e de lipídio, a proteína corporal
283 também pode ser utilizada como fonte energética (Tseng & Hwang 2008).

284

285 **1.4.3. Avaliação do metabolismo**

286 O efeito de alguma variável (i.e. nutricional ou ambiental) sobre a dinâmica
287 energética de um organismo é usualmente estudado através do monitoramento de
288 indicadores do status metabólico, i.e. a taxa de consumo de oxigênio e a dinâmica das
289 reservas energéticas. Especificamente quando se busca avaliar o efeito da salinidade,
290 inclui-se o monitoramento da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (McCormick 1995, Da Silva
291 Rocha et al. 2005, Baldisserotto et al. 2007, Saoud et al. 2007).

292 A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase está diretamente correlacionada com o
293 funcionamento do mecanismo osmorregulatório (Baldisserotto et al. 2007) e devido a
294 sua elevada importância seu funcionamento, bem como seu comportamento em
295 diferentes salinidades, está destacado no item 1.4.4 dessa tese.

296 Já o consumo de oxigênio e o conteúdo de glicogênio hepático são parâmetros
297 indiretamente correlacionados à osmorregulação. O consumo de oxigênio reflete o
298 processo de liberação da energia das moléculas orgânicas, ou seja, a respiração.
299 Entretanto, o processo respiratório não supre energia somente para o mecanismo
300 osmorregulatório e sim para todas as funções fisiológicas (Marshall & Grosell 2006). E
301 no caso de ocorrer um déficit energético, na maioria dos peixes, é a glicogenólise que o
302 organismo busca como primeira opção para reparar/sanar esta “demanda metabólica
303 global” e não somente referente à demanda osmorregulatória (Tseng & Hwang 2008).
304 As respostas do consumo de oxigênio em função da salinidade ambiental foram
305 descritas por Kinne (1967) como estando enquadradas em quatro tipos. Na resposta
306 Tipo 1, o efeito da salinidade no metabolismo, especialmente após adequado período de

307 aclimatação, é inexpressivo e por isso não altera a taxa de consumo de oxigênio. Peixes
308 que apresentam a resposta do Tipo 1 são geralmente aqueles considerados eurialinos.

309

310 **1.4.4. A osmorregulação**

311 Do ponto de vista fisiológico, o ambiente aquático pode ser classificado de
312 acordo com a sua concentração osmótica em relação aos fluídos corporais dos animais
313 que nele habitam como sendo hiposmótico, isosmótico ou hiperosmótico, caso
314 apresentem valor, respectivamente, menor, igual ou superior àquele dos fluídos
315 corporais. Já do ponto de vista ambiental, a resolução nº357 de 17 de março de 2005 do
316 Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) classifica as águas de acordo com
317 sua salinidade, sendo água doce aquela com salinidade inferior ou igual a 0,5, água
318 salobra aquela de salinidade superior a 0,5 e inferior a 30, e água salina aquela com teor
319 de sal igual ou superior à salinidade 30.

320 Osmorregulação é a função fisiológica responsável por manter a concentração
321 osmótica dos fluídos corpóreos independente da concentração osmótica da salinidade do
322 meio que o circunda (Marshall & Grosell 2006). A maioria dos peixes se encontra em
323 ambientes que não são isosmóticos aos seus fluídos corpóreos, ou seja, a concentração
324 osmótica do meio interno difere daquela do meio externo. Os peixes que possuem este
325 mecanismo fisiológico são classificados como osmorreguladores e os que não o
326 possuem como osmoconformadores (Baldisserotto 2009).

327 Todos os peixes teleósteos são osmorreguladores no ambiente em que vivem e
328 algumas espécies possuem ainda a capacidade de sintetizar novas proteínas de

329 transporte (i.e., Na^+, K^+ -ATPase) à medida que se movem entre os ambientes de
330 diferentes salinidades (Kidder III et al.2006). Essas são classificadas como eurialinas e
331 podem habitar áreas com uma ampla faixa de salinidade. De qualquer forma, em
332 ambiente hiposmótico será realizado trabalho osmorregulatório para manter a
333 concentração osmótica interna acima daquela do meio externo (hiper-regulação), assim
334 como em ambiente hiperosmótico será realizado trabalho osmorregulatório para manter
335 a concentração osmótica interna abaixo daquela do meio externo (hipo-regulação)
336 (Marshall & Grosell 2006, Baldisserotto 2009).

337

338 *A Na^+, K^+ -ATPase*

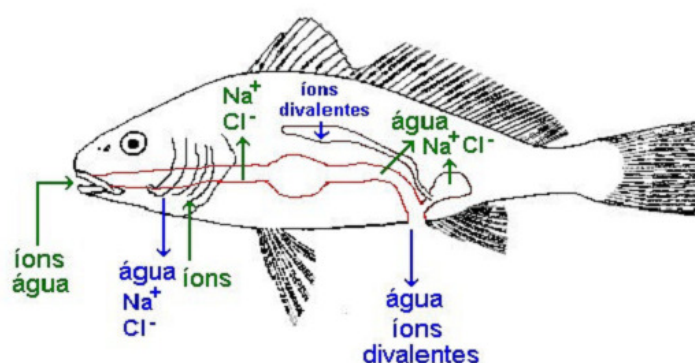
339 A Família das enzimas conhecidas como “ATPases” são caracterizadas por
340 catalisarem a hidrólise do ATP. Neste processo, além da formação do ADP (adenosina
341 difosfato) e a disponibilização de fosfato inorgânico, ocorre a liberação de energia
342 (Nelson & Cox 2007). Especificamente, a Na^+, K^+ -ATPase emprega esta energia na
343 execução de trabalho osmótico , i.e., para gerar potencial de membrana e efetuar
344 transporte ativo de íons, sendo local de ocorrência é a célula de cloreto, que por sua vez
345 encontram-se nos filamentos branquiais (Hwang & Lee 2007).

346 A relação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase com a salinidade pode apresentar dois
347 tipos de resposta: (1) linear - quando o aumento da atividade é diretamente proporcional
348 ao aumento da salinidade, e (2) “Padrão U” - quando ocorrem maiores valores de
349 atividade enzimática em salinidades extremas (Herrera et al. 2009).

350

351 *A osmorregulação em água salgada – Hipo-regulação*

352 O desafio osmorregulatório enfrentado por peixes teleósteos em ambiente
 353 hiperosmótico em relação ao seu fluído interno é a perda de água por osmose e o ganho
 354 excessivo de íons por difusão (Figura 10) (Marshall & Grosell 2006). Para manter a
 355 concentração osmótica sanguínea mais ou menos constante neste tipo de ambiente,
 356 deverá ser executado trabalho osmótico para compensar a perda osmótica de água e
 357 eliminar o ganho difusivo de íons (Baldiasserotto 2009) (Figura 11). Neste contexto, os
 358 principais órgãos “recrutados” para realização deste trabalho osmótico são o esôfago, o
 359 intestino, as brânquias, o rim e a bexiga urinária (Baldiasserotto et al. 2007).



361 Figura 10. Esquema ilustrativo das vias de perda (azul) e ganho (verde) de íons e água em
 362 ambiente hiper-osmótico (Fonte: Baldiasserotto 2009).

364 No intuito de manter o balanço osmótico sanguíneo, os teleósteos em ambiente
 365 marinho ingerem água salgada para posterior absorção osmótica de água “doce”. A
 366 absorção de água “doce” na porção posterior do intestino é possível porque a água
 367 salgada ingerida é dessalinizada ao longo do trato digestório (Taylor & Grosell 2006).

Os íons absorvidos nesse processo de dessalinização, bem como os provenientes naturalmente do ambiente externo por difusão, precisam ser eliminados do organismo.

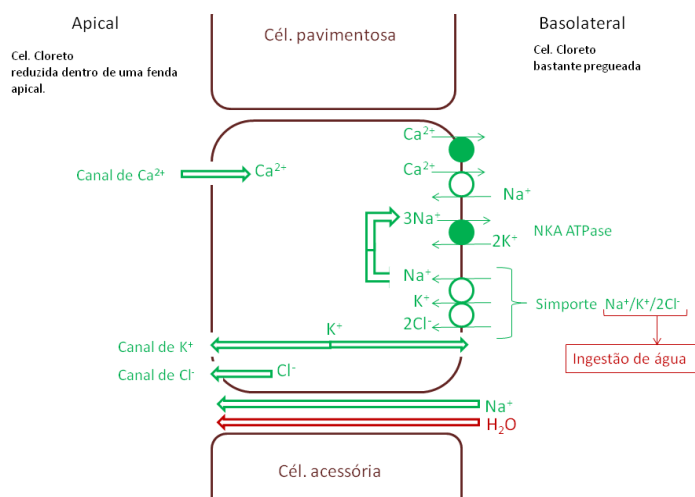


Figura 11. Esquema ilustrativo da excreção de íons pelas brânquias de teleósteos em ambiente hiper-osmótico (adaptado de Baldisserotto 2009).

A excreção do excesso de íons monovalentes é realizada devido a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ presente nas células de cloreto dos filamentos branquiais (Figura 13), enquanto os íons divalentes são excretados diretamente com o fluído intestinal e através dos rins e da bexiga urinária (Marshall & Grosell 2006). Além do seu papel na excreção de íons divalentes, os rins também minimizam a perda de água através da redução do volume filtrado, produzindo assim uma urina concentrada. Em água salgada, a bexiga urinária dos teleósteos também possui função osmótica através da reabsorção de água e eliminação de íons divalentes, tendo em vista a permeabilidade seletiva das membranas deste órgão. Em ambiente hiperosmótico, a bexiga urinária é permeável a íons monovalentes e água e impermeável a íons divalentes, sendo que, similarmente ao que

383 ocorre no intestino, a reabsorção de íons monovalentes ocorre na verdade para
 384 possibilitar a posterior reabsorção de água (Baldisserotto 2009).

385

386 *A osmorregulação em água doce – Hiper-regulação*

387 O desafio osmorregulatório enfrentado por peixes em ambiente hiposmótico
 388 em relação ao seu fluído interno é o ganho osmótico de água e a perda difusiva de íons
 389 (Figura 12). O trabalho osmótico necessário neste tipo de ambiente para manter a
 390 concentração osmótica corresponde à reposição de íons para compensar a perda difusiva
 391 e a eliminação do excesso de água adquirido por osmose (Marshall & Grosell 2006) .

392 O papel osmorregulatório é desempenhado basicamente pelos mesmos órgãos
 393 que na durante a hipo-regulação (intestino, brânquias, rins e bexiga urinária), diferindo
 394 apenas no tipo de trabalho realizado por estes.

395

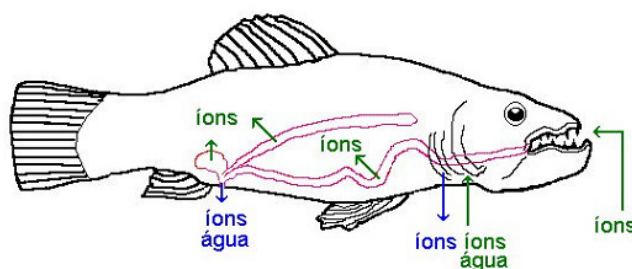


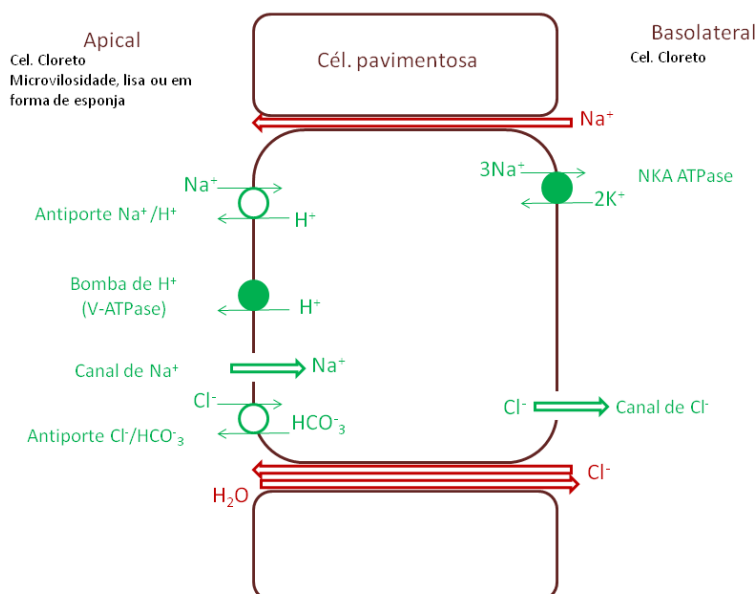
Figura 12. Esquema descritivo das vias de perda (azul) e ganho (verde) de íons e água em ambiente hiposmótico (Fonte: Baldisserotto 2009)

396

397 Para manter o equilíbrio osmótico, os rins e a bexiga urinária dos teleósteos em
398 ambiente dulcícola são responsáveis por manter uma elevada taxa de filtração, no
399 intuito de maximizar a produção e a excreção de um elevado volume de urina
400 (Baldisserotto 2009).

401 Por sua vez, o intestino, como na hipo-regulação, desempenha o papel de absorver
402 os íons através da ação da Na^+, K^+ -ATPase. Entretanto, os íons absorvidos, ao invés de
403 serem eliminados, são mantidos no plasma para compensar a perda difusiva natural
404 destes íons para o ambiente externo. Além disso, os íons absorvidos no intestino
405 também não são mais provenientes da ingestão da água salgada, que não ocorre em
406 ambiente hiposmótico, e sim do alimento ingerido (Baldisserotto et al. 2007).

407 Em relação ao que é observado em ambiente hiperosmótico, o papel da Na^+, K^+ -
408 ATPase branquial é invertido em ambiente hiposmótico. Neste caso, esta enzima é
409 responsável pela reposição de íons perdidos por difusão através da geração de um
410 gradiente favorável a captação destes íons no ambiente (Hwang & Lee 2007) (Figura
411 13).



412 Figura 13. Esquema ilustrativo da captação de íons pelas brânquias de teleósteos em
413 ambiente hiposmótico (adaptado de Baldisserotto 2009).

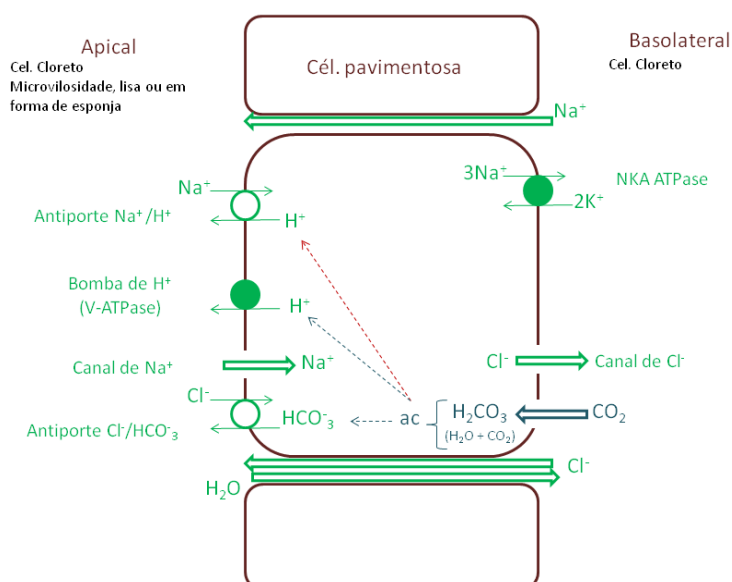
414

415 *Osmorregulação e outras funções fisiológicas*

416 Em geral, o estudo das funções fisiológicas é compartimentalizado, visando
417 facilitar a compreensão do funcionamento dos organismos. No entanto, os mecanismos
418 fisiológicos atuam como um conjunto de elementos que interagem entre si e se
419 complementam, visando à manutenção da homeostasia do organismo (Jobling 1994).
420 No que se referem aos mecanismos osmorregulatórios, estes também interagem e se
421 complementam com outras funções fisiológicas e, por isso, a complexidade na
422 identificação de uma resposta fisiológica frente a uma variável específica (Boeuf &
423 Payan 2001). Dentre as funções que interagem com os processos osmorregulatórios,
424 encontram-se a respiração, manutenção do equilíbrio ácido-base e a absorção de
425 nutrientes (Baldisserotto 2009).

426 *Interação entre osmorregulação, respiração e o equilíbrio ácido-base*

427 As brânquias são responsáveis simultaneamente pela manutenção do equilíbrio
 428 iônico (ionorregulação) e osmótico (osmorregulação), pela captação do oxigênio
 429 utilizado no processo de liberação da energia das moléculas orgânicas provenientes da
 430 alimentação (oxidação), bem como pela excreção do produto final (gás carbônico -
 431 CO_2) deste processo (respiração) (Tseng & Hwang 2008, Nelson & Cox 2007).



432
 433 Figura 14. Esquema ilustrativo da interação entre a osmorregulação (verde), a
 434 respiração (azul) e a excreção (vermelho) nas brânquias de teleósteos em ambiente
 435 hiposmótico (adaptado de Baldisserotto 2009).

436
 437 Ao entrar na célula branquial, o gás carbônico resultante da respiração realizada
 438 pelas demais células do organismo se liga a uma molécula de água, processo conhecido
 439 como hidratação do gás carbônico, dando origem assim ao ácido carbônico (H_2CO_3). A
 440 dissociação desse ácido, através de reação catalisada pela anidrase carbônica (ac), gera o

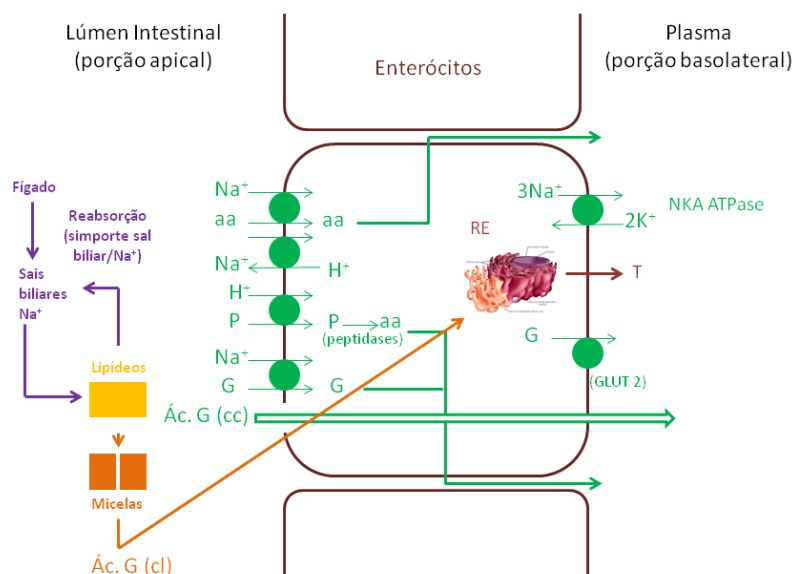
441 íon bicarbonato (HCO_3^-), o qual é excretado da brânquia para o meio ambiente durante
442 o processo de absorção do íon cloreto (Cl^-) a partir deste. Este processo é realizado pelo
443 antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ presente na membrana apical da célula branquial. Além do HCO_3^- ,
444 a dissociação do H_2CO_3 também gera o íon hidrogênio (H^+), o qual é excretado da
445 célula ambiental para o meio ambiente durante o processo de absorção do Na^+ a partir
446 deste. Por sua vez, este processo é realizado pelo antiporte Na^+/H^+ ou a bomba de H^+
447 (V-ATPase) presentes na membrana apical da célula branquial (Marsahll & Grosell
448 2006) (Figura 14).

449

450 ***Interação entre osmorregulação e absorção de nutrientes***

451 Como todos os demais animais, os peixes se alimentam visando à obtenção de
452 substratos energéticos para manutenção do seu metabolismo (catabolismo e anabolismo)
453 (Nelson & Cox 2007). Entretanto, a ingestão e digestão do alimento, por si só, não
454 garante seu aproveitamento (absorção) pelo animal (Gatlin III 2002).

455 Após a digestão dos alimentos, as unidades estruturais básicas das proteínas,
456 carboidratos e lipídios são absorvidas para corrente sanguínea dos peixes, processo este
457 que ocorre no intestino. Entretanto, a presença de Na^+ no lúmen intestinal é um dos
458 elementos fundamentais para a absorção dos aminoácidos (aa), da glicose e dos ácidos
459 graxos, a qual ocorre na porção apical das células de revestimento das vilosidades
460 intestinais, conhecidas como enterócitos (Baldisserotto 2009).



461

462 Figura 15. Esquema ilustrativo da interação entre a osmorregulação (verde) e a absorção
 463 de nutrientes (vermelho) no intestino de teleósteos (adaptado de Baldisserotto 2009).

464

465 A absorção das proteínas pode ocorrer por duas vias. Uma delas ocorre através da
 466 membrana apical com a molécula na sua forma íntegra e/ou na forma de peptídeos,
 467 processo este que ocorre através do co-transporte com o H⁺. Este simporte é viabilizado
 468 pela ação do antiporte Na⁺/H⁺, o qual gera gradiente favorável à entrada de H⁺ nos
 469 enterócitos (Figura 15). Uma vez dentro destas células, as peptidases intracelulares
 470 realizam a hidrólise das proteínas e peptídeos em aminoácidos, os quais são então
 471 transferidos para a corrente sanguínea. A outra via de absorção das proteínas e
 472 peptídeos é realizada através da membrana apical na forma de aminoácidos por ação do
 473 simporte aa/Na⁺. Por sua vez, este simporte é viabilizado pela ação da Na⁺,K⁺-ATPase,
 474 que cria gradiente favorável à entrada de Na⁺ nos enterócitos (Baldisserotto et al. 2009).

O transporte da glicose, unidade estrutural básica dos carboidratos, ocorre através do simporte glicose/ Na^+ na membrana apical do enterócito e do transportador GLUT 2 ou por exocitose na membrana basolateral desta célula. Por fim, no caso da absorção de ácidos graxos de cadeia longa, que assim como os ácidos graxos de cadeia curta, constituem a unidade estrutural básica dos lipídios, a contribuição do Na^+ ocorre de forma mais indireta, através da ação dos sais biliares. A ação destes sais permite a formação de micelas de lipídios, as quais possibilitam o contato dos graxos de cadeia longa com a membrana apical, onde são transportados por difusão e ressintetizados sob a forma de triglicerídeos no retículo endoplasmático liso. Por sua vez, os triglicerídeos seguem para o citoplasma do enterócito através das lipoproteínas e, a seguir, para os capilares sanguíneos (Baldisserotto et al. 2009).

486

1.4.5. Osmorregulação *versus* Aquicultura

A “*Teoria isosmótica*”

A aquicultura procura dispor ao organismo criado um ambiente que proporcione a maximização do seu crescimento. Este objetivo é buscado através da manipulação de fatores bióticos e abióticos que influenciam o crescimento. Dentre os fatores abióticos manipuláveis, a salinidade é um dos mais focados devido sua comprovada influencia não só no crescimento, mas também em outras funções fisiológicas (Jobling 1994, Boeuf & Payan 2001, Sampaio & Bianchini 2002, Nordlie 2009, Rodhy et al. 2010, O'Neill et al. 2011, Pérez et al. 2011). Peixes são capazes de manter seu equilíbrio

496 iônico e osmótico independente do ambiente externo, entretanto o funcionamento deste
497 mecanismo demanda gasto de energia metabólica (Sampaio & Bianchini 2002).

498 De acordo com Jobling (1994) o crescimento é o resultado da diferença entre a
499 energia suprida pelo consumo de alimento e o gasto metabólico com a manutenção dos
500 processos vitais para manutenção da vida. A “Teoria Isosmótica” então se baseia na
501 hipótese de que o crescimento é incrementado em um ambiente onde não existe um
502 gradiente osmótico entre os fluídos corporais (*milieu intérieur*) do peixe e o ambiente
503 externo que o circunda, ou seja, quando os ambientes são isosmóticos (Woo & Kelly
504 1995, Boeuf & Payan 2001, Sampaio & Bianchini 2002, Herrera et al. 2009, Nordlie
505 2009). De modo geral, para peixes teleósteos, a osmolaridade dos fluídos corpóreo varia
506 entre 280-320 mOsm, o que corresponde a um ambiente isosmótico na salinidade ~12‰
507 (Woo & Kelly 1995, Boeuf & Payan 2001, Sampaio & Bianchini 2002, Tsuzuki et al.
508 2007, Herrera et al. 2009, Nordlie 2009). Entretanto, a significância do gasto energético
509 osmorregulatório tem se mostrado ser espécie-específica e mudar durante o período de
510 desenvolvimento (Morgan & Iwama 1991, Boeuf & Payan 2001, Kidder III et al. 2006).

511 Peixes eurialinos podem viver em uma ampla faixa de salinidade devido a sua
512 habilidade de sintetizar novas proteínas de transporte de sal ao longo de seu
513 deslocamento entre ambientes de diferentes salinidades (Kidder III et al. 2006). Esta
514 característica biológica favorece o desenvolvimento e a criação de peixes eurialinos,
515 visto que é possível a utilização de águas de diferentes salinidades, de acordo com as
516 suas disponibilidades e condições econômicas.

517

518 **1.5. A pesca e aquicultura**

519 O Brasil contribuiu em 2009 com 0.86% da produção mundial de pescado
520 (pesca e aquicultura), ocupando assim a 18ª posição no ranking dos maiores produtores
521 de pescado, que tem a China, Indonésia e Peru como primeiro, segundo e terceiro países
522 mais produtivos, respectivamente. Entretanto, se considerarmos apenas o pescado
523 produzido pela pesca, o Brasil ocupa apenas a 23ª posição no ranking mundial (MPA
524 2008/2009).

525 No contexto nacional, a produção brasileira de pescado apresentou em 2010
526 um crescimento de 2% em relação a 2009. Este acréscimo foi devido ao incremento na
527 produção da pesca extrativa continental (3,9%) e da aquicultura continental (16,9%) e
528 marinha (9%). Por sua vez, a pesca extrativa marinha apresentou uma redução de 8,4%
529 em relação a 2009. No ranking das espécies mais pescadas, em ordem crescente, estão a
530 sardinha verdadeira, a corvina, a pescada amarela, o bonito-listrado e a tainha.

531 Apesar de ocupar o 5º lugar na produção da pesca nacional, no contexto local a
532 tainha é uma espécie de grande aceitação no mercado interno e feiras livres. Esta
533 espécie é usualmente comercializada eviscerada, mas também pode ser encontrada na
534 forma de filé. Outro produto proveniente da tainha e que possui grande valor de
535 mercado é a ova, caviar ou “bottarga” (Fig. 16), como é conhecida no mundo da
536 gastronomia (Ramírez et al. 2007). Esta iguaria possui uma elevada demanda para
537 exportação, alcançando o preço de até R\$ 2,00 por grama do produto (Fig. 17).



Figura 16. Ova de tainha *Mugil sp.* in natura”. (Fonte: <http://www.tungpao.com/en/news.html>)

538 O fato é que o mercado consumidor existe, mas há carência de tecnologias de
 539 produção e de investimentos para incrementar o produto final e melhorar a qualidade
 540 além de diversificar da oferta de produtos de origem marinha (Ferreira et al. 2006). Para
 541 agravar a situação, na verdade também há a carência do produto em si, já que de modo
 542 geral sua oferta se restringe basicamente ao período reprodutivo.



Figura 17. Ova de *Mugil sp.* embalada a vácuo. (Fonte: <http://www.newsobserver.com/2010/10/17/742582/real-fish.html>)

543

544 Desta forma, a criação da tainha em cativeiro pode ser uma alternativa para
 545 suprir a demanda existente, além de contribuir para a redução da exploração pesqueira e

546 recuperação dos estoques naturais. Para tanto, é necessário que sejam conhecidos os
547 aspectos fundamentais da fisiologia da espécie, sobretudo os mecanismos associados a
548 adaptação à salinidade do ambiente.

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562 2. OBJETIVOS

563

564 2.1. Objetivo principal

565 O principal objetivo desta tese foi avaliar o comportamento osmorregulatório da
566 tainha *Mugil liza* e a implicação dos conhecimentos gerados na produção desta espécie
567 em cativeiro.

568

569 2.2. Objetivos específicos

570

571 2.2.1. Verificar o efeito de diferentes salinidades sobre a (Experimento 1):

572 ✓ Sobrevivência;

573 ✓ Consumo de oxigênio corporal;

574 ✓ Atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial;

575 ✓ Reserva de glicogênio hepático da tainha *M.S liza*;

576 ✓ Determinar o ponto isosmótico da tainha *M. liza*.

577

578 2.2.2. Verificar o efeito da condição hipo-, iso- e hiper-osmótica - “Teoria Isosmótica”

579 - da água sobre a (Experimento 2):

580 ✓ Sobrevivência;

581 ✓ Consumo de alimento;

582 ✓ Parâmetros zootécnicos;

583 ✓ Consumo de oxigênio corporal;

584 ✓ Atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial;

585 ✓ Reserva de glicogênio hepático da tainha *M.liza*;

586

587 2.2.3. Avaliar o efeito do teor de Na^+ na dieta, em água doce, sobre a (Experimento 3):

588 ✓ Sobrevivência;

589 ✓ Consumo de alimento;

590 ✓ Parâmetros zootécnicos;

591 ✓ Atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial;

592 ✓ Reserva de glicogênio hepático da tainha *M.liza*.

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607 3. METODOLOGIA GERAL

609 3.1. Local de realização dos experimentos

610 A parte experimental desta tese foi realizada no Laboratório de Piscicultura
611 Estuarina (LAPEM) do Instituto de Oceanografia (IO) - FURG, enquanto as análises
612 laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Zoofisiologia do Instituto de Ciências
613 Biológicas - ICB - FURG.

614

615 3.2. Origem dos animais

616 Todos os espécimes utilizados foram pescados com rede de arrasto na praia do
617 Cassino e mantidos em caixas com água salgada do ambiente até serem transportadas
618 para a LAPEM, onde foram aclimatados às condições experimentais (Fig. 20).



619

620 Figura 17. Captura de espécimes de *M. liza* na praia do Cassino (Foto: Viviana Lisboa).

3.3. Condições experimentais

Os juvenis de tainha *M. liza* utilizados no primeiro experimento foram mantidos durante 6 meses em tanques de 1000 L (Fig. 18) na mesma salinidade em que foram capturados (salinidade 30) e temperatura de 25°C e fotoperíodo natural (12C:12E). O regime alimentar foi de três vezes ao dia (8, 13 e 17 h) com ração comercial (28% de proteína bruta) até a saciedade aparente. Durante este período, a qualidade da água foi mantida com renovação diária de 80% do volume total.

Os juvenis capturados para o segundo e terceiro experimento foram aclimatados por 20 dias em tanques de 1000 L (Fig. 18) com água na salinidade em que foram capturados (salinidade 30), temperatura de 25°C e fotoperíodo de 14C:10E. O regime alimentar foi de quatro refeições ao dia (9, 13, 17 e 21 h). com ração (50% de proteína bruta). Também durante este período, a qualidade da água foi mantida com renovação diária de 80% do volume total.



Figura 18. Tanques de aclimação.



Figura 19. Sistema experimental capítulo I.

O sistema experimental utilizado no primeiro experimento consistiu de 4 tanques de 300 L (Fig. 19) em sistema semi-fechado e renovação diária de 80% do volume total.

637 Já o sistema utilizado no segundo e terceiro experimento foi composto de 16 tanques de
638 50 L (Fig. 20) em sistema de recirculação, tratamento com UV e filtro mecânico e
639 biológico (Fig. 21).



Figura 20. Sistema experimental experimento II (Foto: Viviana Lisboa).



Figura 21. Biofiltro (Foto: Viviana Lisboa)

640



Figura 22. Biometrias (Foto: Cristina Avelar)



Figura 23. Coleta de tecidos (Foto: Andrea Ferreto)

641

642 **3.4. Parâmetros analisados**

643 Ao final do período de experimental, os peixes foram anestesiados e procedidas as
644 medidas biométricas (Fig. 26) e a coleta de tecidos (sangue, brânquias e fígado) (Fig. 26).

645

646 3.4.1. Índices zootécnicos

647 Ao final dos experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros:

648 - *Percentual de sobrevivência* (S) = $\left(\frac{Ni - Nf}{Ni} \right) \times 100$

649 onde: Ni é o número inicial e Nf é o número final de peixes.

650 - *Taxa específica de crescimento* (SGR) = $\left(\frac{Ln pf - Ln pi}{Tempo} \right) \times 100$

651 onde: pi e pf são o peso inicial e final do peixe, respectivamente.

652 - *Eficiência alimentar* (EA) = $\left(\frac{GB(g)}{AO(g)} \right)$

653 onde: GB é o ganho de biomassa e AO é o alimento ofertado (g).

654 - *Coefficiente de variação do peso* (CVpeso) = $\left(\frac{DE}{Mpesso(g)} \right) \times 100$

655 onde: DE é o desvio padrão e Mpeso é a média do peso.

656 - *Fator de condição* (FC) = $\left(\frac{peso(g)}{C^3(cm)} \right)$

657 onde: C é o comprimento total (cm).

658

659 3.4.2. Osmolalidade plasmática

660 A osmolalidade plasmática foi determinada por depressão do ponto de
661 congelamento, utilizando-se um semi-micro osmômetro (Knauer, Alemanha) (Figura
662 24). Os resultados serão expressos em mOsmoles/Kg H₂O.



Figura 24. Semi-micro osmômetro utilizado para determinação da osmolalidade
(Foto: Viviana Lisboa)

3.4.3. Atividade da Na^+, K^+ -ATPase

A análise da atividade da enzima foi realizada de acordo com a metodologia descrita por McCormick (1993). As amostras de brânquias coletadas foram homogeneizadas com 300 μl de tampão SEID em homogeneizador do tipo Potter (Nova Técnica – Piracicaba, SP, Brasil; Fig. 25) e posteriormente centrifugadas (Mikro22R, Hettich, Alemanha) a 4°C durante 1 min.



Figura 25. Homogeneizador do tipo Potter utilizado para homogeneizar as amostras de tecidos. (Foto: Viviana Lisboa)

673 A placa de determinação foi montada (Figura 26) com 10 µl do sobrenadante e
674 300 µl das soluções de reação (soluções A e B) e a absorbância lida em leitora de
675 microplaca (VICTOR™2, Perkin Elmer, EUA) (Fig. 31). Por sua vez, a análise da
676 concentração de proteína no homogeneizado foi realizada utilizando-se um kit
677 comercial de reagentes para determinação de proteínas totais (Doles, Goiânia, GO,
678 Brasil).



Figura 26. Montagem da placa para análise da atividade enzimática (Foto: Clívea Martins)

679 3.4.4. Taxa de consumo de oxigênio corporal

680 O consumo de oxigênio foi medido de acordo com a metodologia descrita por
681 Cunha et al. (2009). A concentração de oxigênio foi medida a cada 15 min com auxílio
682 de um oxímetro (modelo YSI 55, Hexis) (Fig. 27). Somente foram realizadas medidas
683 quando a teor de oxigênio dissolvido na água era igual ou superior a 70% de saturação,
684 a fim de evitar o efeito da redução do teor de oxigênio dissolvido sobre a taxa

685 respiratória do peixe. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi então calculada
 686 conforme a seguinte fórmula:

$$687 \quad OCR = \frac{(O_i - O_f) \times V}{T \times B}$$

688 onde: O_i e O_f correspondem respectivamente às concentrações inicial e final de
 689 oxigênio ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), V é o volume do tanque (L), B é a biomassa no tanque (g)
 690 e T é o tempo durante o qual foi realizada a medição (h).



Figura 27. Medida do consumo de oxigênio (Foto: Joana Vogeley)

691

692 **3.4.5. Conteúdo hepático de glicogênio**

693 A análise da concentração hepática de glicogênio foi realizada através da
 694 metodologia glicose-oxidase adaptada de Carr & Neff (1984). As amostras de fígado
 695 foram coletadas foram pesadas ($\pm 200 \text{ mg}$) e homogeneizadas com tampão citrato de
 696 sódio (0,1 M) na proporção de 10% do peso da amostra. Após homogeneização, as
 697 amostras permaneceram em banho-maria por 5min. Foi então coletada uma alíquota de

698 100 μ l de homogeneizado e adicionados 20 μ l de amiloglicosidase que, junto com os
699 padrões de glicogênio, foram mantidos em estufa a 55°C durante 2,5 h. Após este
700 período, as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm durante 30 min.

701 O padrão 1 correspondeu a 300 μ l de reagente de cor e 10 μ l de glicogênio,
702 enquanto o padrão 2 foi feito com 300 μ l de reagente de cor e 10 μ l de glicose. A placa
703 de determinação foi preparada (Figura 28) com 300 μ l reagente de cor (Kit Glicose
704 enzimática líquida, DOLES, Goiânia, GO, Brasil), 10 μ l da amostra, 10 μ l de tampão
705 citrato de sódio e os padrões de glicogênio e glicose (Fig. 18). A absorbância das
706 amostras foi lida em leitor de microplaca (Vitor, Perkin-Elmer, EUA) (Fig. 29).

707



Figura 28. Montagem da placa (Foto: Clívea Martins)



Figura 29. Analisador de microplaca (Foto: Clívea Martins)

708

709 3.5. Análise dos dados

710 Para cada parâmetro analisado nos três experimentos, os dados médios ($\pm$ erro
711 padrão) foram comparados entre si por análise de variância (ANOVA) seguida do teste

712 *a posteriori* de Tukey. Os pressupostos da ANOVA (normalidade dos dados e
713 homogeneidade de variâncias) foram previamente testados. O nível de significância a
714 adotado foi de 95% ($\alpha = 0,05$). A comparação entre as médias dos valores da
715 osmolalidade da água de cada salinidade testada e do plasma no experimento 1 foi
716 realizada com o teste *t* de “Student” não pareado. Para determinação do ponto
717 isosmótico, as médias dos valores da osmolalidade da água e do plasma foram
718 submetidos a regressão linear. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado na
719 avaliação da correlação entre o consumo de oxigênio corporal e a atividade da Na^+, K^+ -
720 ATPase branquial no experimento 2. Os dados da atividade da Na^+, K^+ -ATPase
721 branquial e concentração de glicogênio hepático no experimento 1 e os dados de ganho
722 de peso e nível de suplementação de sal no experimento 3 foram sujeitos a análise de
723 regressão não-linear (polinomial, quadrática) e para o cálculo do melhor nível de
724 suplementação de sal no experimento 3 foi aplicada a fórmula $-b/2a$ (Shearer 2000).

725

726

727

728

729

730

731

732 **CAPÍTULO I**

733

734

735

736

737

738

739

740 A aclimação de juvenis de *Mugil liza* a salinidade ambiental

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752 ¹ Artigo submetido a revista **Aquaculture Research**.

753 ² A forma integral deste estudo se encontra no Anexo I desta Tese.

754 RESUMO

755

756 A sobrevivência e os parâmetros fisiológicos associados com o metabolismo e a
757 osmorregulação foram avaliados em juvenis da tainha *Mugil liza* aclimatados em
758 diferentes salinidades (5, 10, 20, 30 e 40‰) durante 15 dias. A temperatura (25°C) e o
759 fotoperíodo (12D:12N) foram controlados. Os peixes foram alimentados duas vezes ao
760 dia com ração comercial (28% PB) até a saciedade aparente. Após a aclimação, foi
761 medida a taxa corporal de consumo de oxigênio e os peixes foram eutanizados para
762 coleta de sangue, brânquias e fígado. A faixa de salinidade testada não apresentou
763 influencia sobre a taxa corporal de consumo de oxigênio ($0,39 \pm 0,03 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e a
764 osmolalidade plasmática ($417,6 \pm 18,0 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$). O ponto isosmótico foi estimado
765 em $412,7 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$ (13,5‰ salinidade). A atividade da Na^+, K^+ -ATPase branquial
766 foi menor nas salinidades 20 e 30‰, enquanto a concentração de glicogênio hepático
767 foi maior na salinidade 20‰. Os resultados indicam que juvenis de *M. liza* são capazes
768 de se aclimatar em um curto intervalo de tempo (15 dias) a uma ampla faixa de
769 salinidade (5-40‰). Esta habilidade é possível devido a ajustes na atividade da Na^+, K^+ -
770 ATPase branquial e do metabolismo do energético para regular a osmolalidade
771 plasmática e o metabolismo energético aeróbico. Finalmente, os resultados apontam
772 para possibilidade da criação de juvenis da tainha *M. liza* em águas estuarinas e
773 marinhas.

774

775

776 **CAPÍTULO II**

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787 O efeito da salinidade na sobrevivência, crescimento e parâmetros bioquímicos em
788 juvenis da tainha *Mugil liza*

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799 ¹ Artigo submetido a revista **Aquaculture Research**.

800 ² A forma integral deste estudo se encontra no Anexo II desta Tese.

801 **RESUMO**

802

803 Teoricamente o custo energético da osmorregulação pode ser minimizado quando um peixe
804 teleosteo é mantido numa condição isosmótica. Também é esperado que a energia poupada
805 nessa condição possa beneficiar o crescimento. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o
806 crescimento e a performance metabólica de juvenis da tainha *Mugil liza* criada durante 40 dias
807 nas salinidades (0, 6, 12 e 24‰) correspondentes a 0, 50, 100 e 200% do ponto isosmótico da
808 espécie (salinidade 12‰). Os tratamentos foram realizados com quatro repetições contendo 30
809 peixes por tanque (peso $0,48 \pm 0,1$ g e comprimento $3,27 \pm 0,1$ cm). A temperatura da água e a
810 saturação de oxigênio foram mantidas em $28,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e acima de 90%, respectivamente. Os
811 peixes foram alimentados com dieta artificial (50% PB) quatro vezes ao dia até a saciedade
812 aparente. Os resultados demonstraram que a salinidade influencia o crescimento de juvenis da
813 tainha. Os exemplares criados na salinidade 24‰ cresceram mais que os mantidos em água
814 doce (salinidade 0 ‰). A atividade da enzima $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ nas brânquias e o consumo de
815 oxigênio apresentaram o padrão de resposta quadrático, com a ocorrência dos valores menores
816 nas salinidades intermediárias. Já o conteúdo de glicogênio hepático apresentou uma relação
817 direta com o aumento da salinidade, mas não houve diferença significativa entre as salinidades.
818 Analisados em conjunto, os resultados indicam que a demanda energética da osmorregulação
819 em juvenis de *M. liza* pode ser minimizada em ambiente isosmótico. Entretanto, a quantidade de
820 energia poupada parece não ser suficientemente significativa para beneficiar o seu crescimento.
821 Também há uma indicação de que a tainha é capaz de alternar seu substrato energético durante a
822 sua aclimação à salinidade.

823 **Palavras-chave:** glicogênio, crescimento, tainha, $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{-ATPase}$, salinidade, consumo de
824 oxigênio.

825 **CAPÍTULO III**

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836 A suplementação de sal na dieta para juvenis de *Mugil liza* mantidos em água doce

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848 ¹ Artigo no formato de submissão para revista Fish Physiology and Biochemistry.

849 ² A forma integral deste estudo se encontra no Anexo III desta Tese.

850 **RESUMO**

851 A suplementação de sal na dieta para peixes marinhos/estuarinos é utilizada para
852 melhorar seu desempenho quando criados em baixa salinidade e/ou em água doce. A
853 tainha *Mugil liza* é uma espécie eurialina e pode ser criada em água doce. O objetivo
854 deste estudo foi avaliar sua performance zootécnica e fisiológica em água doce e
855 alimentados com ração suplementada com quatro níveis de NaCl durante 45 dias. A
856 concentração de sal (Na^+) das dietas foi determinada por espectrofotômetro de absorção
857 atômica e correspondeu a 0,9, 5,4, 8,0, e 13,2% de suplementação de sal (SS). Um total
858 de 240 peixes (peso $4,5 \pm 0,1\text{g}$ e comprimento $7,41 \pm 0,03\text{cm}$) foi distribuído
859 aleatoriamente em 16 tanques colocados em um sistema de recirculação de água
860 equipado com filtro mecânico e biológico, controle de temperatura e esterilização por
861 UV. A temperatura se manteve em 27°C , a saturação de oxigênio acima de 89% e o
862 fotoperíodo foi de 14C:14E. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia até a
863 saciedade aparente. A sobrevivência (S), eficiência alimentar aparente (EAA) e a
864 concentração de glicogênio hepático entre os tratamentos foram similares ($p>0,05$).
865 Entretanto, a taxa de crescimento específica (G), o consumo de ração e o Coeficiente de
866 Condição de Fulton (FC) decresceram com o aumento dos níveis de suplementação de
867 sal ($p<0,05$). A concentração de Na^+ acima de 5,4% prejudicou o crescimento das
868 tainhas, enquanto a G e AFC e a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ foram, respectivamente,
869 mais baixos e mais alta especificamente em 13,2% SS ($p<0,05$). A similaridade da EAA
870 entre os tratamentos associado a menor G, menor consumo de alimento, a maior
871 atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ em 13,2% SS pode ser causada pela pior palatabilidade

872 da ração e pelo aumento na secreção de sal em excesso na dieta. Finalmente, os juvenis
873 de tainha alimentados com ração suplementada até 5,4% SS apresentaram uma resposta
874 zootécnica e fisiológica positiva, comparada a juvenis alimentados com a maior
875 concentração de sal. Entretanto, o melhor nível de Na^+ para o crescimento foi
876 determinado em 2,6%.

877 **Palavras-chave: Suplementação de sal, osmorregulação, água doce.**

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895 CONCLUSÕES GERAIS

896

897 Capítulo I

898 A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento foi possível calcular a
899 salinidade isosmótica da espécie em estudo, tendo assim sido possível demonstrar que
900 juvenis da tainha *Mugil liza* possui um mecanismo osmorregulatório bem desenvolvido,
901 que lhe capacita a tolerar uma ampla faixa de variação de salinidade de forma tão
902 eficiente que nenhum dos parâmetros fisiológicos analisados no estudo para monitorar o
903 comportamento da espécie frente à salinidade ambiental foi afetado por este parâmetro.
904 Entretanto, o suprimento de energia metabólica necessária para a manutenção da
905 osmorregulação parece ser pelo menos em parte, oriunda da mobilização das reservas
906 hepáticas de glicogênio.

907 Capítulo II

908 Os resultados obtidos no segundo experimento demonstraram que a tainha *M.*
909 *liza* em seus estágios iniciais do desenvolvimento também possuem seus mecanismos
910 osmorregulatórios bem estabelecidos e que existe uma tendência de menor gasto
911 energético em salinidades ambientais em torno daquela isosmótica em relação aos
912 fluídos corporais do peixe. Entretanto, a quantidade de energia poupada nesta condição
913 ambiental não é significativamente suficiente para incrementar o crescimento do animal,
914 que por sua vez está reduzido em água doce quando comparado com aquele observado
915 em águas salobras e marinhas. Além disso, foi observado que nesta faixa de

916 desenvolvimento o fornecimento de energia metabólica para a manutenção da
917 osmorregulação não provém de suas reservas hepáticas de glicogênio.

918

919 **Capítulo III**

920 O terceiro experimento demonstrou que a suplementação de sal na dieta para
921 juvenis de *M. liza* mantidos em água doce proporcionou um resultado positivo tanto em
922 seu desempenho zootécnico quanto fisiológico. Entretanto, a suplementação de sal na
923 dieta deve ser aplicada em níveis adequados para espécie, visto que quando realizada
924 em excesso pode, além de prejudicar a palatabilidade do alimento e afetar/diminuir o
925 seu consumo, gera um maior gasto energético devido a necessidade de excretar este
926 excesso de sal do organismo. Também deve ser levada em consideração a manutenção
927 do equilíbrio nutricional da ração após a manipulação desta, visto que seu desbalanço
928 nutricional também pode afetar o crescimento de forma indireta. Similarmente, o
929 fornecimento de energia metabólica para o reestabelecimento da homeostase parece não
930 ser proveniente das reservas energéticas de glicogênio hepático. Desta forma, o melhor
931 nível de suplementação de sal na dieta para juvenis desta espécie foi estimado em 2,6%.

932

933

934

935

936

937 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

938 Esta tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito da
939 salinidade no desempenho zootécnico e fisiológico da tainha *Mugil liza* e sua
940 implicação no desenvolvimento de tecnologia para sua produção em cativeiro.
941 Inicialmente, exemplares da espécie foram submetidos a uma ampla faixa de salinidade
942 para, além de avaliar seu comportamento osmorregulatório, determinar a salinidade
943 ambiental que é isosmótica aos fluídos corporais do peixe. Os resultados demonstraram
944 que juvenis de *M. liza* são capazes de manter sua homeostasia osmorregulatória
945 independente da salinidade ambiental e que, ao menos em parte, o custo energético dos
946 processos fisiológicos para reestabelecer sua homeostasia provém da mobilização de
947 suas reservas de glicogênio hepático.

948 Uma vez que foi descrito para algumas espécies, e não para outras, que o
949 crescimento é incrementado em salinidade isosmótica, no segundo experimento
950 realizado nesta tese exemplares de *M. liza* foram submetidos por 40 dias a salinidades
951 correspondentes a 0, 50, 100 e 200% da salinidade isosmótica, a fim de verificar se a
952 “Teoria Isosmótica” seria aplicável à espécie em estudo. Os resultados obtidos
953 demonstraram que a salinidade ambiental na faixa testada não afetou a sobrevivência da
954 tainha. Além disso, mostrou que indivíduos nas fases iniciais de desenvolvimento
955 também conseguem manter a sua homeostasia osmótica independente da salinidade do
956 ambiente externo, apresentando uma tendência geral de menor gasto energético com a
957 osmorregulação quando a salinidade do meio externo está isosmótica àquela do meio
958 interno. No entanto, ficou evidente que o ambiente dulcícola prejudica o crescimento

959 dos indivíduos da espécie estudada. Também foi observado que nesta faixa de
960 desenvolvimento o fornecimento de energia metabólica para a manutenção de sua
961 homeostase não provém da mobilização das reservas de glicogênio hepático.

962 Visto que o crescimento foi prejudicado em água doce e que a suplementação de
963 sal na ração é uma prática estabelecida para algumas espécies, o terceiro estudo foi
964 desenvolvido para avaliar se a suplementação de sal poderia amenizar o efeito negativo
965 do ambiente dulcícola sobre o crescimento de juvenis da tainha *M. liza*. Exemplares
966 juvenis desta espécie foram então mantidos em água doce e alimentados com ração
967 suplementada com 0,9, 5,4, 8,0 e 13,2% de sódio na ração durante 45 dias. A
968 suplementação de sal até atingir um conteúdo de 5,4% de sal na ração proporcionou um
969 resultado positivo tanto no desempenho zootécnico quanto fisiológico da espécie. No
970 entanto, o teor de sódio ideal na ração foi estimado em 2,6%. Assim, fica claro que a
971 suplementação de sal na dieta deve ser aplicada em níveis adequados para cada espécie,
972 visto que o excesso de sal pode prejudicar a palatabilidade do alimento e,
973 consequentemente, diminuir o seu consumo. Além disso, o excesso de sal também pode
974 elevar o gasto energético devido à necessidade de excreção deste excesso de sal pelo
975 organismo. Também deve ser levada em consideração a necessidade da manutenção do
976 equilíbrio nutricional da ração, pois a manipulação da ração pode provocar um
977 desbalanço nutricional e de forma indireta prejudicar o crescimento do peixe.
978 Similarmente ao observado no segundo experimento, a energia canalizada para o
979 reestabelecimento da homeostase em tainhas mantidas em água doce e alimentadas com

980 ração suplementada com sal parece não ser proveniente das reservas energéticas de
981 glicogênio hepático.

982 De modo geral, os resultados apresentados nesta tese demonstram que a tainha
983 *M. liza* possui um mecanismo osmorregulatório bem desenvolvido desde seus estágios
984 iniciais de desenvolvimento, capacitando assim a espécie a manter sua homeostasia
985 osmorregulatória independente da salinidade ambiental. Entretanto, o tipo de substrato
986 priorizado na manutenção da demanda energética excedente em situações não ideais
987 para a manutenção do funcionamento dos processos fisiológicos difere com o período
988 de desenvolvimento. Por fim, a presente tese confirma o potencial que *M. liza* possui
989 para aquicultura. Porém, mais estudos são necessários para o estabelecimento da
990 tecnologia de criação desta espécie.

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001 **BIBLIOGRAFIA**

- 1002 ANDRADE-TALMELLI, EF, E ROMAGOSA, MY NARAHARA & HM GODINHO.
 1003 1996. Características reprodutivas de tainha *Mugil planatus* (Teleostei,
 1004 Peciformes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo.
 1005 *Revista Ceres*, 43 (246): 165-185.
- 1006 AZIM, ME, MCJ VERDEGEM, MM RAHMAN, MA WAHAB, AA DAM VAN &
 1007 MCM BEVERIDGE. 2002. Evaluation of polyculture of Indian major carps in
 1008 periphyton-based ponds. *Aquaculture*, 213: 131–149.
- 1009 BALDISSEROTTO B 2009. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura, 2 ed., Editora
 1010 UFSM. Santa Maria. Brasil. 352p.
- 1011 BALDISSEROTTO B, ROMERO JMM. & KAPOOR BG. 2007. Fish Osmoregulation.
 1012 Science Publishers. New Hampshire. USA. 527p.
- 1013 BOEUF G & P PAYAN. 2001. How should salinity influence fish growth?
 1014 *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 130: 411–423.
- 1015 CAFSI, M EL, MS ROMDHANE, A CHAUOUCH, W MASMOUDIA, S KHE'RIJIA,
 1016 F CHANUSSOTD & CHER'RIF. 2003. Qualitative needs of lipids by mullet,
 1017 *Mugil cephalus*, fry during freshwater acclimation. *Aquaculture*, 225: 233-241.
- 1018 CANDIDO, AS, AP MELO JÚNIOR, CHA SANTOS, HJMS COSTA & MA
 1019 IGARASHI. 2006. Policultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) com
 1020 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. ciên. vet. zool.*, 9 (1): 9-14.

- 1021 CARR, RS & JM NEFF. 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue
1022 glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **77**: 447-449.
- 1023 CARVALHO, CVA, A BIANCHINI, M TESSER & LA SAMPAIO. 2010. The effect of
1024 protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile
1025 mullet *Mugil planatus* (Gunther). *Aquaculture Research*, 41: 511-518.
- 1026 COSTA, LCO, LFM NEVES, JA XAVIER, VC LISBOA, MRC FIGUEIREDO & WFB
1027 WASIELESKY JR. 2008. Policultivo de tainha *Mugil platanus* com camarão
1028 *Litopenaeus vannamei* em viveiros de terra no extremo sul do Brasil. 45ª Reunião
1029 Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais. Lavras, MG – UFLA.
- 1030 CUNHA VL, RV RODRIGUES, MH OKAMOTO & LA SAMPAIO. 2009. Consumo
1031 de oxigênio pós-prandial de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência*
1032 *Rural*, 49: 1257-1259.
- 1033 DA SILVA ROCHA A.J., V GOMES, P.VAN NGAN, M.J. DE A.C.R. PASSO, R.R.
1034 FÚRIA. 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus*
1035 *parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and*
1036 *Ecology* 316: 157-165.
- 1037 FERREIRA, FA. 2006. Desenvolvimento de produto tipo caviar a base de ovas de
1038 tainha (*Mugil platanus*). Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos,
1039 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil, 77 p.

- 1040 FISCHER, LG, JP VIEIRA & LED PEREIRA. 2011. Peixes estuarinos e
1041 costeiros. 2.ed. Rio Grande, Luciano Gomes Fischer. 130 p.
- 1042 FONSECA NETO & H SPACH. 1998/1999. Survival of juveniles of *Mugil platanus*
1043 Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) in different salinities. *Boletim do Instituto de*
1044 *Pesca*, 25:13-17.
- 1045 FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS (FAO)
1046 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. Rome, FAO – Fisheries
1047 and Aquaculture department. 197p. Disponível na internet no endereço:
1048 <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>. Acessado em 24/10/2012.
- 1049 GALVÃO, MSN, N YAMANAKA, N FENERICH-VERANI & CMM PIMENTEL.
1050 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil*
1051 *planatus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e
1052 juvenil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 24: 101-110.
- 1053 GARG, SK & A BHATNAGAR. 2000. Effect of fertilization frequency on pond
1054 productivity and fish biomass in stillwater ponds stocked with *Cirrhinus mrigala*
1055 (Ham.). *Aquaculture Research*, 31: 409–414.
- 1056 GATLIN III, DM. 2002. Fish Nutrition. JE Halver and RW Hardy (Eds.), 3rd edition.
1057 London: Academic Press.
- 1058 GODINHO, HM, PCS SERRALHEIRO & JD SCORVO FILHO. 1988. Revisão e
1059 discussão de trabalhos sobre a espécie do gênero *Mugil* (Teleostei, Peciformes,

- 1060 Mugilidae) da costa brasileira (Lat.3°S-33°S). *Boletim do Instituto de Pesca*,
1061 15(1): 67-80.
- 1062 GODINHO HM, ET KAVAMOTO, EF ANDRADE-TALMELLI, PCS
1063 SERRALHEIRO, P PAIVA & EM FERRAZ.1993. Induced spawning of the
1064 mullet *Mugil pl atanus* (Gunther, 1880), in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Boletim*
1065 *do Instituto de Pesca*, 20: 59-66.
- 1066 GODINHO, HM. 2005. Tainha. Páginas 433-444 In: BALDISSEROTTO, B, LC
1067 GOMES, (Org.). Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. UFSM Press, Santa
1068 Maria pp. 541-558.
- 1069 HANDELAND SO, A BERGE, BTH BJORNSSON & SO STEFANSSON. 1998.
1070 Effect of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic
1071 salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater. *Aquaculture*, 168: 289-302.
- 1072 HERRERA M, L VARGAS-CHACOFF, I HACHERO, I RUÍZ-JARABO, A
1073 RODILES, JIN NAVAS & JM MANCERA. 2009. Osmoregulatory changes in
1074 wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different
1075 environmental salinities. *Aquaculture Research*, 40: 762-771.
- 1076 HWANG P-P & LEE T-T. 2007. New insights into fish ion regulation and
1077 mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 148: 479-
1078 497.
- 1079 JOBLING, M. 1994. Fish Bioenergetics. London: Chapman & Hall. 294 p.

- 1080 KESHAVANATH, P, TJ RAMESH, B GANGADHAR, MCM BEVERIDGE, AA
1081 VAN DAM & MCJ VERDEGEM. 2001. Farm evaluation of Indian major carp
1082 production with sugarcane Bagasse as substrate for periphyton. *Asian Fish. Sci.*,
1083 14: 367–376.
- 1084 KIDDER III GW, CW PETERSEN & RL PRESTON. 2006. Energetics of
1085 osmoregulation: II. Water Flux and osmoregulatory Work in the Euryhaline Fish,
1086 *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology A*, 305: 318-327.
- 1087 KINNE, O. 1967. Physiology of estuarine organisms with especial reference to salinity
1088 and temperature: general aspects, p: 525-540. In: LAUFF, GH (ED). *Estuaries*.
1089 Hardcover, Washington, DC, 757 p.
- 1090 LUPARSCH, I, T KATZ & DL ANGEL. 2003. Assessment of removal efficiency of
1091 fish farm effluents by grey mullets: a nutritional approach. *Aquaculture Research*,
1092 34: 1367-1377.
- 1093 MAÇADA, AP, MH OKAMOTO & LA SAMPAIO. 2000. Avaliação preliminar do
1094 cultivo de tainha *Mugil platanus* em tanque-rede. In: XIII Semana Nacional de
1095 Oceanografia (Anais), Itajaí, SC, 684-686 p.
- 1096 MC CORMICK, SD. 1993. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺,
1097 K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Aquatic Sciences*, 50: 656-658.
- 1098 MENEZES, AN & JL FIGUEIREDO 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do
1099 Brasil. São Paulo, USP. 96 p.

- 1100 MENEZES, NA, C OLIVEIRA & M NIRCHIO. 2010. An old taxonomic dilemma: the
1101 identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes:
1102 Mugilidae). *Zootaxa*, 2519: 59-68.
- 1103 MEURER, F, C HAYASHI, WR BOSCOLO & CM SOARES. 2002. Lipídeos na
1104 Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*,
1105 L.). *R. Bras. Zootec.*, 32 (2): 566-573.
- 1106 MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA (MPA). 2010. BOLETIM
1107 ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA. Brasil 2008-2009. 101p.
1108 Disponível em:
1109 http://www.sepaq.pa.gov.br/files/u1/anuario_da_pesca_completo.pdf. Acessado
1110 em 24/10/2012.
- 1111 MIRANDA-FILHO, KC, W WASIELESKY & AP MAÇADA. 1995. Efeito da amônia
1112 e nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces:Mugilidae). *Revista*
1113 *Brasileira de Biologia*, 55: 45-50.
- 1114 MIRANDA FILHO, K, MB TESSER., LA SAMPAIO & HM GODINHO. 2010.
1115 Tainha. 541-558 p. In: BALDISSEROTTO, B & LC GOMES. Espécies Nativas
1116 para Piscicultura no Brasil, 2º edição. (ed. by B.). Editora da UFSM, Santa Maria.
1117 606 p.
- 1118 MORGAN, JD & GK IWAMA. 1991. Effects of salinity on growth, metabolism and
1119 ion regulation juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and

- 1120 Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and*
1121 *Aquatic Sciences*, 48: 2083-2094.
- 1122 MORGAN, IJ, ID MCCARTHY & NB METCALFE. 2000. Life-history strategies and
1123 protein metabolism in overwintering juvenile Atlantic salmon: growth is enhanced
1124 in early migrants through lower protein turnover. *Journal of Fish Biology*, 56:
1125 637-647.
- 1126 NELSON, DL & MM COX 2007. Lehninger, Principles of Biochemistry, 4 ed., Worth
1127 Publishers, New York.
- 1128 NORDLIE, FG. 2009. Environmental influences on regulation of blood plasma serum
1129 components in teleost fish: a review. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 19: 481-564.
- 1130 OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre
1131 o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther,
1132 1880. *Atlântica*, 28: 61-66.
- 1133 OLIVEIRA, AF & MA BEMVENUTI. 2006. Ciclo de vida de alguns peixes do estuário
1134 da Lagoa dos Patos, RS, informações para o ensino fundamental e médio.
1135 *Cadernos de Ecologia Aquática*, 1(2): 16-29.
- 1136 OLIVEIRA, IR & LSH SOARES. 1996. Alimentação da tainha *Mugil platanus*
1137 Günther, 1880 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunas de Cananéia, São
1138 Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 23: 95–104.

- 1139 O'NEILL, B, F DE RAEDEMAECKER, D MCGRATH & D BROPHY. 2011. An
 1140 experimental investigation of salinity effects on growth, development and
 1141 condition in European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Journal of Experimental*
 1142 *Marine Biology and Ecology*, 410: 39-44.
- 1143 PÉREZ-ROBLES, J, AD RE, I GIFFARD-MENA & F DÍAZ. 2011. Interactive effects
 1144 of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and
 1145 Na^+/K^+ -ATPase expression in bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns
 1146 1842). *Aquaculture Research*, 43:1372-1383.
- 1147 RAMÍREZ, JA, A DEL ÁNGEL, RM URESTI, G VELASQUEZ & M VÁSQUES.
 1148 2007. Low-salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using
 1149 microbial transglutaminase or whey protein concentrate as additives. *Food*
 1150 *Chemistry*, 102: 243-249.
- 1151 REIS, EG & F D' INCAO. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme
 1152 Southern Brazil: an effort to wards community-based management. *Ocean &*
 1153 *Coastal Management*, 43: 585-595.
- 1154 ROMAGOSA, E, EFA TALMELLI, MY NARAHARA & HM GODINHO. 1999. Tipo
 1155 de desova e fecundidade da *Mugil platanus* da região estuarino-lagunar de
 1156 Cananéia, SP. *Revista Atlântica*, 22: 5-12.

- 1157 RODHY NR, NA NISSIF & KL MAIN 2010. Effects of salinity on growth and survival
1158 of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) larvae. *Aquaculture*
1159 *Research*, 41:357-360.
- 1160 SCORVO FILHO, JD, ERA DIAS, LMS AYROZA & PFC NOVATO. 1992. Efeito da
1161 densidade sobre o desenvolvimento de alevinos da tainha listrada (*Mugil*
1162 *platanus*) em água doce. *Boletim do Instituto de Pesca*, 19: 105-109.
- 1163 SAMPAIO, LA, A MINILLO & AH FERREIRA. 1998. Growth of juvenile mullet
1164 (*Mugil platanus*) fed on different rations. In: *Aquicultura Brasil '98 (Anais)*,
1165 Recife, PB, 2: 109-115p.
- 1166 SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on
1167 laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Gunther, 1880). *Act*
1168 *Scientiarum*, 23: 471-475.
- 1169 SAMPAIO, LA & A BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth
1170 of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental*
1171 *Marine Biology and Ecology*, 269: 187-196.
- 1172 SAMPAIO, LA, W WASIELESKY JR & KC MIRANDA FILHO. 2002. Effect of
1173 salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*.
1174 *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 668-674.
- 1175 SAOUD I.P., S. KREYDIYYEH, A. CHALFOUN & M. FAKIH. 2007. Influence of
1176 salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na⁺K⁺-ATPase activity in

- 1177 the rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and*
1178 *Ecology* 348, 183-190.
- 1179 TAYLOR, JR & GROSELL. 2006. Feeding and osmoregulation: dual function of the
1180 marine teleost intestine. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2939-2951.
- 1181 TSENG, Y-C & P-P HWANG. 2008. Some insights into energy metabolism for
1182 osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 148: 419-
1183 429.
- 1184 TSUZUKI, MY, JK SUGAI, JC MACIEL, CJ FRANCISCO & VR CERQUEIRA.
1185 2001. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook
1186 (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, 261: 319-
1187 325.
- 1188 YAMANAKA, N, MSN GALVÃO, JR OLIVEIRA, CMM PIMENTEL, S TANJI, RA
1189 SILVA, MC PORTELLA, NET ROJAS & E ABUD. 1991. Larvicultura da tainha
1190 *Mugil planatus* em Cananéia, SP. In: Encontro Nacional de Pesca e Aqüicultura,
1191 Santos. *Resumos...* p.96.
- 1192 WOO, NYS & SP KELLY. 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and
1193 metabolism of *Sparus sarba* in closed seawater system. *Aquaculture*, 135: 229-
1194 238.
- 1195 VAN DEN THILLART, G & M VAN RAAIJ. 1995. Endogenous fuels; noninvasive
1196 versus invasive. In: HOCHACHKA PW & TP MOMMSEN (Eds). *Biochemistry*

1197 and Molecular Biology of Fishes, Volume 4, Metabolic Biochemistry, Elsevier
1198 Science, Amsterdam. 33-63 p.

1199 VIEIRA, JP. 1991. Juvenile Mulletts (Pisces: Mugilidae) in the Estuary of Lagoa dos
1200 Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 2: 409-418.

1201 VIEIRA, JP & C SCALABRIN. 1991. Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil*
1202 *platanus*) Günther 1880, no sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 131-141.

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

1212

1213

1214 **ANEXO I**

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223 Acclimation of juvenile lebranche mullet *Mugil liza* to environmental salinity

1224

1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236 **Artigo submetido a revista Aquaculture Research**

1237 **Acclimation of juvenile lebranche mullet *Mugil liza* to environmental salinity**

1238 Viviana Lisboa da Cunha¹, Indianara Fernanda Barcarolli², Luís André Sampaio³ and Adalto
1239 Bianchini^{2*}

1240

1241 ¹Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Oceanografia, Programa de Pós-
1242 graduação em Oceanografia Biológica, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio
1243 Grande, RS, Brazil

1244

1245 ²Universidade Federal do Rio Grande – FU

1246 RG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio
1247 Grande, RS, Brazil

1248

1249 ³Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Oceanografia, Laboratório de
1250 Piscicultura Marinha, Rua do Hotel nº 02, 96203-900, Querência, Rio Grande, RS, Brazil

1251

1252 *Corresponding author: Adalto Bianchini, Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
1253 Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio Grande,
1254 RS, Brazil. Tel./Fax.: +55 53 3293 5193; e-mail: adaltobianchini@furg.br

1255

1256 Running title: Salinity acclimation in juvenile mullet

1257

1258 **Keywords:** glycogen, mullet, Na⁺,K⁺-ATPase, salinity, osmoregulation, oxygen consumption

1259 **Abstract**

1260 Survival and physiological parameters associated with metabolism and osmoregulation were
1261 evaluated in juveniles of the lebranche mullet *Mugil liza* acclimated to different water salinities
1262 (5, 10, 20, 30, and 40‰) for 15 days. Room temperature (25°C) and photoperiod (12L:12D)
1263 were fixed. Fish were fed twice-a-day with commercial diet (28% crude protein) until satiation.
1264 After acclimation, whole-body oxygen consumption was measured and fish were euthanized
1265 and sampled for blood, gills, and liver. Whole-body oxygen consumption ($0.39 \pm 0.03 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}$
1266 h^{-1}) and blood osmolality ($417.6 \pm 18.0 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$) did not change in the range of salinities
1267 tested. The isosmotic point was estimated as $412.7 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$ (13.5‰ salinity). Gill Na⁺,K⁺-
1268 ATPase activity was lower at 20 and 30‰, while liver glycogen content was higher at 20‰
1269 salinity. These results indicate that juvenile *M. liza* is able to acclimate for a short-period of
1270 time (15 days) to a wide range of salinities (5-40‰). This condition is achieved through
1271 adjustments in gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and carbohydrate metabolism to regulate plasma
1272 osmolality and aerobic/energy metabolism. Therefore, our findings support the idea of growing
1273 juvenile lebranche *M. liza* in estuarine and marine waters.

1. Introduction

Aquaculture practices seek to develop a healthy and sustainable environment through the control of biotic and abiotic factors in order to maximize fish growth. Among abiotic factors, the influence of water salinity on fish growth has been widely reported (Tandler, Anav & Choshniak 1995; Woo & Kelly 1995; Sampaio & Bianchini 2002; Barman, Jana, Garg, Bhatnagar & Arasu 2005; Resley, Webb Jr. & Holt 2006).

Euryhaline teleost fish can activate biochemical and physiological mechanisms to face changes in environmental salinity. In low salinities, i.e. below the isosmotic point, they absorb salts (Na^+ and Cl^-) through the gills to counteract the diffusive loss of ions. In turn, the osmotic gain of water is compensated by production and copious excretion of dilute urine. In high salinities, i.e. above the isosmotic point, they drink and desalinize salt water at the digestive tract. In this case, water is osmotically absorbed through the intestinal wall and the excess of salts (Na^+ and Cl^-) is actively secreted at the gills. As a result, a water gain and salt loss is achieved, thus counteracting the obligatory osmotic loss of water and the diffusive gain of salts associated with the osmotic gradient existing between the fish blood plasma and salt water. Playing with these homeostatic mechanisms, euryhaline teleost fish are able to keep their blood osmolality more or less constant over a wide range of water salinities (Baldisseroto 2009).

It is clear from the above that changes in energy consumption are expected to occur associated with fish osmotic regulation over a wide range of environmental salinities. According to Handeland, Berge, Bjornsson and Stefansson (1998), the osmoregulatory cost is proportional to the osmotic gradient. Therefore, lower energy expenditure would be expected to occur when fish blood plasma is isosmotic with the environmental medium. Indeed, an isosmotic

environment has been reported to maximize fish growth, since less energy would be spent in the osmoregulatory process (Woo & Kelly 1995; Boeuf & Payan 2001; Sampaio & Bianchini 2002; Tsuzuki, Sugai, Maciel & Cerqueira 2007; Herrera, Vargas-Chacoff, Hachero, Ruíz-Jarabo, Rodiles, Navas & Mancera 2009; Nordlie 2009). This phenomenon will be referred hereafter as the “Isosmotic Theory”. According to this theory, the energy spared on osmoregulation can be used for fish growth maximization. However, there is still no consensus on the significance of the energy sparing mechanism as being an important one that would actually improve fish growth. Furthermore, this phenomenon seems to be species-specific (Jobling 1994). Accurate measurements of the amount of energy spared when fish are maintained at an isosmotic environment are difficult to perform because of the complex interactions existing among the osmoregulatory mechanisms and other physiological processes, which are in turn influenced by environmental factors, as well as the methodology employed. Boeuf and Payan (2001) reported that the energy spared by fish with osmoregulation can range from 10% to more than 50% of the total energy budget.

Blood osmolality, gill Na^+, K^+ -ATPase activity, whole-body oxygen consumption and liver glycogen content are physiological parameters usually measured to evaluate the effect of salinity in fish (McCormick 1995; Da Silva Rocha, Gomes, Van Ngan, Passo & Fúria 2005; Baldisserotto, Romero & Kapoor 2007; Saoud, Kreydiyyeh, Chalfoun & Fakih 2007). While blood osmolality and gill Na^+, K^+ -ATPase activity are directly related to the function of the osmoregulatory mechanisms, whole-body oxygen consumption and liver glycogen content are indirectly associated with the osmotic energy demand.

The taxonomic status of Mugilidae from the Caribbean and South American Atlantic coast has been recently revised. Fish previously identified as *Mugil platanus* are now correctly identified as the lebranche mullet *Mugil liza* (Menezes, Oliveira and Nirchio 2010). This teleost

fish is an important item for estuarine and coastal fisheries in Southern South America (Reis & D’Incao 2000). Furthermore, it has been considered for aquaculture in estuarine and marine waters in Brazil. The lebranche mullet shows a small dietary protein requirement (Carvalho, Bianchini, Tesser & Sampaio 2010), thus occupying a low position in the food web (Oliveira & Soares, 1996).

It was shown that growth of juvenile *M. liza* is improved at temperatures between 25 and 30°C (Okamoto, Sampaio & Maçada 2006). However, little is known about the salinity effect on juvenile lebranche mullet. Sampaio, Wasielesky Jr. and Miranda Filho (2002) showed that tolerance of juvenile lebranche mullet to ammonia and nitrite is improved in fish acclimated to intermediate and high salinities respect to those maintained in fresh water. Fonseca Neto and Spach (1998/1999) reported no mortality after 96 h of abrupt transfer of juvenile *M. liza* from salt water (salinity 30‰ salinity) to lower salinities (15, 10 and 5‰ salinity). However, no data on juvenile lebranche mullet acclimated to different salinities are reported.

In light of the above, the main objective of the present study was to evaluate survival and the response of physiological parameters associated with osmoregulation in juveniles of the lebranche mullet *M. liza* acclimated to a wide range of salinities (5-40‰ salinity). Physiological endpoints analyzed included blood osmolality, gill Na⁺,K⁺-ATPase activity, whole-body oxygen consumption, and liver glycogen content.

2. Materials and Methods

2.1 Fish collection and acclimation

Juvenile *M. liza* were captured at Cassino Beach (Rio Grande, RS, southern Brazil) and transferred to the Laboratory of Marine Fish Culture of the Universidade Federal do Rio Grande – FURG (Rio Grande, RS, southern Brazil). Fish acclimation to laboratory conditions was performed in two 1,000-L tanks containing salt water at 25°C and salinity corresponding to that of the collection site (salinity 30‰ salinity). Tanks were maintained under natural photoperiod (12 h L:12 h D). Fish were fed twice-a-day (from 10:00 to 11:00 h and from 17:00 to 18:00 h) with a commercial diet (28% crude protein) until satiation. Feces produced were siphoned out daily and at least 50% of the experimental medium was renewed.

2.2 Experimental design

After acclimation to laboratory conditions for 20 days, 30 fish (wet body weight: 56 ± 0.9 g; total length: 18.0 ± 0.1 cm) were starved for 24 h, individually weighed (wet body weight; electronic scale; precision: 0.01 g) and measured (total length), randomly divided into five groups (6 fish per tank). Juvenile mullets were abruptly transferred from salt water at salinity 30‰ salinity to salt water at salinity 5, 10, 20, 30 or 40‰ salinity. Salt water at the different experimental salinities was obtained by diluting concentrated salt water (salinity 40‰ salinity) with tap water. In turn, concentrated salt water was obtained by evaporation at 50°C. Fish were maintained at the experimental salinities for 15 days. Water temperature, dissolved oxygen content (oxymeter YSI Model), salinity (refractometer, Atago), pH (pH meter, Quimis), and total ammonia (APHA 2005) were measured daily. Water samples were also collected over the experimental period for osmolality measurements using a semi-micro osmometer (Knauer, Germany) based on the freezing depression point.

1366 2.3 Whole-body oxygen consumption

1367 At the end of the experimental period, whole-body oxygen consumption was measured
 1368 following the procedures described by Cunha, Rodrigues, Okamoto and Sampaio (2009).
 1369 Dissolved oxygen content in the water was recorded every 15 min using an oximeter (YSI
 1370 model Hexis 55). Measurements were performed until the water saturation level with oxygen
 1371 dropped to 70% of its maximum to avoid a possible effect of this water parameter on fish
 1372 oxygen consumption. The rate of oxygen consumption (*OC*) was calculated using the following
 1373 equation:

$$1374 \quad OC = (O_i - O_f) \times V / T \times B$$

1375 where O_i and O_f correspond to the initial and final dissolved oxygen content in the water (mg O₂
 1376 L⁻¹), respectively, V is the tank volume (L), B is the fish biomass (g), and T is the measurement
 1377 duration (h).

1378

1379 2.4 Tissue collection and analysis

1380

1381 After the oxygen consumption measurement, fish were anesthetized (50 ppm benzocain)
 1382 and blood samples were collected by heart puncture using 1-mL heparinized disposable syringes
 1383 and centrifuged. Plasma obtained was collected and stored in ultrafreezer (-80°C) for further
 1384 osmolality measurement, as described below. The second gill arch at the left side of the gill
 1385 chamber and the liver were dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored in
 1386 ultrafreezer (-80°C) for further measurement of gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and liver glycogen
 1387 content, respectively, as described below.

Fish plasma osmolality was determined using the semi-micro osmometer (Knauer, Germany) based on the freezing depression point. The fish isosmotic point was assessed by considering the intersection of the isosmotic line with the regression line estimated between plasma and water osmolality as described by Sampaio and Bianchini (2002).

Gill samples were homogenized with 300 μ l SEID buffer (pH 7.3) and centrifuged at 10,000 g for 30 min (4°C). The supernatant was used for Na⁺,K⁺-ATPase activity determination following procedures described by McCormick (1993).

Liver glycogen content was determined using an adaptation of the method of Carr and Neff (1984). Glucose concentration was analyzed using a commercial reagent kit based on the glucose-oxidase method (Doles, Goiânia, GO, Brazil).

2.5. Data presentation and analysis

Results were expressed as mean $\pm$ standard error (n = 6). For whole-body oxygen consumption and plasma osmolality data, significant differences among salinities were assessed by One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. For each salinity, comparison of mean values between water and plasma osmolality was performed using the non-paired Student *t*-test. Water and plasma osmolality data were subjected to linear regression analysis. Gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and liver glycogen content data were subjected to non-linear regression analysis (polynomial, quadratic). For all analyses, the level of significance adopted was 95% ($\alpha = 0.05$).

3. Results

Dissolved oxygen content, temperature and ammonia concentration ($\text{NH}_3\text{-N}$) in the water did not change throughout the experimental period and among treatments ($P > 0.05$). Therefore, a general mean value was calculated for dissolved oxygen content ($6.34 \pm 0.18 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), temperature ($24.0 \pm 0.20^\circ\text{C}$) and ammonia concentration ($0.03 \pm 0.00 \text{ NH}_3\text{-N}$). However, water pH increased significantly ($P < 0.05$) from 7.70 ± 0.06 at 5‰ salinity to 8.02 ± 0.06 at 40‰ salinity.

No fish mortality was observed over the whole experimental period. No significant change was observed in whole-body oxygen consumption in the range of salinities tested. The general mean value was $0.39 \pm 0.03 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Also, plasma osmotic concentration did not change among water salinities. The general mean value was $417.6 \pm 18.0 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$. However, a significant difference was observed between plasma and water osmolality in all salinities tested, except at 10‰ salinity. Plasma osmolality was higher than water osmolality in fish maintained at 5‰ salinity and lower than water osmolality in fish kept at 20, 30 and 40‰ salinity (Table 1). The slope value of the regression line between plasma and water osmolality was not significant ($b = 0.023$; $P > 0.05$). The isosmotic point of juvenile lebranche mullet was estimated as $412.7 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$, which corresponded to 13.5‰ salinity.

Gill Na^+, K^+ -ATPase activity was lower at intermediate salinities (20 and 30‰) and higher at extreme salinities (5 and 40‰), thus following an inverse polynomial quadratic function (Fig. 1). In contrast, liver glycogen content was higher in fish maintained at 20‰ salinity than in those maintained at 5 or 40‰ salinity, thus following a direct polynomial quadratic function (Fig. 2).

1433 4. Discussion

1434 In the present study, we analyzed the effect of salinity on survival, blood osmolality, gill
 1435 Na^+, K^+ -ATPase activity, whole-body oxygen consumption and liver glycogen content in
 1436 juveniles of the lebranche mullet *M. liza* acclimated to different salinities (5-40‰). Results from
 1437 this study improve our knowledge on the osmoregulation ability of this fish species, thus
 1438 providing more information supporting its possible cultivation in estuarine and coastal waters in
 1439 southern South America.

1440 Like other Mugilidae, *M. liza* inhabits estuarine waters as nursery ground. When the
 1441 breeding season approaches, they migrate to the ocean for spawning and return as juveniles to
 1442 the estuary for feeding purposes (Vieira, Castello & Pereira 1998). Therefore, it is clear that *M.*
 1443 *liza* is naturally subjected to important changes in environmental salinity over its life cycle. An
 1444 adequate ability to cope with these changes is imperative for *M. liza* to complete its life cycle.
 1445 This ability was clearly observed in juvenile *M. liza* exposed to a wide range of salinities. This
 1446 statement is based on the following facts: (1) juvenile mullets tested in the present study were
 1447 able to survive after abrupt transfer from 30‰ to different experimental salinities (5-40‰); (2)
 1448 no significant change in plasma osmolality was observed after acclimation of juvenile mullets to
 1449 different environmental salinities, and (3) the slope of the regression line between plasma and
 1450 water osmolality was not significant ($b = 0.023$), indicating a strong capacity of juvenile mullets
 1451 to regulate plasma osmolality in a wide range of water salinities.

1452 The well-developed osmoregulatory capability showed by juvenile *M. liza* tested in the
 1453 present study (180 mm body length) combined with the fact that juvenile *M. liza* smaller than
 1454 28-33 mm are not able to tolerate abrupt transfer from 30‰ salinity to fresh water (Fonseca &
 1455 Spach 1998/1999) suggests that juvenile lebranche mullets has already fully developed their

1456 osmoregulatory ability. In fact, changes in this ability are shown to occur over the ontogenetic
 1457 development of other fish species such as the fat snook *Centropomus parallelus* (Tsuzuki et al.
 1458 2007) and the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Sampaio, Freitas, Okamoto,
 1459 Louzada, Rodrigues & Robaldo 2007). Unfortunately, there is no report describing the
 1460 ontogenesis of osmoregulation in the lebranche mullet *M. liza*. However, the fact that the full
 1461 osmoregulatory capability of the stripped mullet *M. cephalus* is reached when individuals
 1462 achieve 40-69 mm body length (Nordlie, Szelistowski & Nordlie 1982) supports the idea that a
 1463 fully developed osmoregulatory ability is already present in juveniles of the lebranche mullet *M.*
 1464 *liza* tested in the present study (180 mm body length).

1465 As observed in the present study, no significant effect of water salinity changes on
 1466 plasma osmolality is generally observed in euryhaline teleost fish. However, a slightly positive
 1467 correlation between environmental and plasma osmolality is commonly observed. This fact
 1468 could be associated with the dehydration suffered by fish exposed to hyperosmotic
 1469 environments (Sampaio & Bianchini 2002; Lin, Chen & Lee 2003; Resley et al. 2006; Saoud et
 1470 al. 2007). However, this seems not to be the case for juvenile lebranche mullets since the slope
 1471 of the regression line between plasma and water osmolality found was not significant ($b =$
 1472 0.023). In fact, plasma osmolality in the lebranche mullet *M. liza* (mean value: 417.6 ± 18.0
 1473 mOsmol Kg^{-1}) was maintained above the mean value of plasma osmolality reported for
 1474 diadromous fish (fresh water: $310.0 \pm 6.5 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$; sea water: $402.6 \pm 20.4 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$), including the stripped mullet *M. cephalus* (fresh water: $326.7 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$; sea water: 356.7
 1475 mOsmol Kg^{-1}) (Nordlie et al. 1982; Nordlie 2009).

1477 The isosmotic point for the juvenile lebranche mullet was estimated as 412.7 mOsmol
 1478 Kg^{-1} , which corresponded to 13.5‰ salinity. In this case, fish is hyper-regulating above this
 1479 environmental salinity and hypo-regulating above it. According to the “Isosmotic Theory”, a

lower gill Na^+, K^+ -ATPase activity and oxygen consumption would be expected in water salinities close to the isosmotic point. Reduced energy consumption, indirectly indicated in the present study by higher liver glycogen content, would be also expected in water salinities close to that where fish is isosmotic respect to the environment. However, whole-body oxygen consumption of juvenile lebranche mullet did no change significantly among water salinities. Moreover, despite the gill Na^+, K^+ -ATPase activity and liver glycogen content followed a U-shape curve according to the water salinity, the lower mean value of enzyme activity was observed at 20 and 30‰ salinity and the higher mean value of liver glycogen content was found at 20‰ salinity. Therefore, these findings clearly do not support the “Isosmotic Theory”.

Regarding gill Na^+, K^+ -ATPase activity, our data are in contrast to those reported for juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Morgan & Iwama 1998) and gilthead sea bream *Sparus aurata* (Laiz-Carrión, Sangiao-Alvarellos, Guzmán, Río, Soengas, Mancera 2005). In these fish species, gill enzyme activity also followed a U-shape pattern with the environmental salinity, but the lowest value was found in water salinity close to the isosmotic point. Nevertheless, our results are in agreement with those reported for the rabbitfish *Siganus rivulatus*, where enzyme activity also followed a U-shape pattern across a wide range of water salinities with the lower values being observed in water salinities not close to that corresponding to the isosmotic point (14.6‰ salinity) (Saoud et al. 2007). Furthermore, it was shown that gill Na^+, K^+ -ATPase activity in the milkefish *Chanos chanos* did not show a clear pattern of change across salinities, with the lower enzyme activity value being found at 35‰ salinity (Lin et al. 2003). Actually, Morgan and Iwama (1998) have suggested that the response of the gill Na^+, K^+ -ATPase activity to environmental salinity may be species-dependent, which could explain the great variability observed among euryhaline fish species.

In contrast to our findings, oxygen consumption in *M. cephalus* acclimated for 8 days in laboratory augmented with increasing water salinity (Nordlie & Leffler 1975). In turn, the oxygen consumption changes observed in the present study with the juvenile *M. liza* acclimated for 15 days to different environmental salinities correspond to the Type 1 response described by Kinne (1967). Similar to our findings, Morgan and Iwama (1998) reported that water salinity did not influence oxygen consumption in juvenile coho salmon. Therefore, it seems that 15 days is a suitable period of time to acclimate the juvenile lebranche *M. liza* to different environmental salinities without changes in the aerobic metabolism.

Osmoregulation is an energy demanding activity and is fuelled mainly by glucose (Pérez-Robles, Re, Giffard-Mena & Díaz 2011). This carbohydrate is an important source that provides energy for animal metabolism and an increased plasma concentration of this metabolite after osmotic stress has been reported for several fish species (Herrera et al. 2009). Depending on stress intensity and duration, the plasma glucose level can be sustained through glycogenolysis (Baldisserotto et al. 2007), which is a known secondary response to stress (Urbinate & Carneiro 2004). The liver glycogen concentration in juvenile lebranche significantly decreased at the extreme salinities tested (0 and 40‰). This finding is in complete agreement with that observed for gill Na^+, K^+ -ATPase activity, suggesting that the energy demand to regulate the plasma osmotic concentration in extreme conditions was likely provided through glucose oxidation. In this case, a higher glycogen mobilization from liver would occur, thus leading to the observed lower glycogen content in the liver.

Finally, many authors have discussed on the advantages of keeping fish under isosmotic conditions. This practice would imply that the energy saved in the absence of an important osmotic work could maximize fish growth (Boeuf & Payan 2001; Saoud et al. 2007; Tsuzuki et al. 2007). However, this theory seems to be species-specific, since it has been proved for some

fish species (Woo & Kelly 1995), but not for other (Sampaio & Bianchini 2002). Therefore, results from the present study will be useful to select the 'ideal' water salinity for growing the juvenile lebranche *M. liza* and whether the 'Isosmotic Theory' can be considered for this species. Also, it is important to note that our findings clearly indicate that juvenile lebranche *M. liza* is able to keep its plasma osmotic homeostasis after 15 days after of acclimation to a wide range of salinities through adequate adjustments in gill Na^+, K^+ -ATPase and liver glycogen metabolism, without significant changes in the aerobic metabolism.

5. Acknowledgments

V.L. Cunha is a PhD fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil). L.A. Sampaio and A. Bianchini are research fellows from the Brazilian CNPq. A. Bianchini is also supported by the International Canadian Research Chair Program (International Development Research Centre – IDRC, Ottawa, Canada).

6. References

- Amaral M.C., Bonecker A.C.T. & Ortiz C.H.D. (2001) Activity determination of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase and Mg^{++} -ATPase enzymes in the gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in different salinities. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **44**, 1-6.
- APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Ed. American Public Health Association. Washington. 1193p.

- 1549 Baldisserotto B. (2009). Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura, 2 ed., Editora UFSM.
1550 Santa Maria. Brasil. 352p.
- 1551 Baldisserotto B., Romero J.M.M. & Kapoor B.G. (2007). Fish Osmoregulation. Science
1552 Publishers. New Hampshire. USA. 527p.
- 1553 Barman U.K., Jana S.N., Garg S.K., Bhatnagar A. & Arasu A.R.T. (2005). Effect of inland
1554 water salinity on growth, feed conversion efficiency and intestinal enzyme activity in
1555 growing grey mullet, *Mugil cephalus* (Linn.): Field and laboratory studies. *Aquaculture*
1556 *International* **13**, 241-256.
- 1557 Boeuf G. & Payan P. (2001) How should salinity influence fish growth? *Comparative*
1558 *Biochemistry and Physiology C* **130**, 411-423.
- 1559 Carr R.S. & Neff J.M. (1984) Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen.
1560 *Comparative Biochemistry and Physiology B* **77**, 447-449.
- 1561 Carvalho C.V.A., Bianchini A., Tesser M. & Sampaio L.A. (2010) The effect of protein levels
1562 on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil planatus*
1563 (Gunther). *Aquaculture Research* **41**, 511-518.
- 1564 Cunha V.L, Rodrigues R.V., Okamoto M.H. & Sampaio L.A. (2009) Consumo de oxigênio pós-
1565 prandial de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural* **49**, 1257-1259.
- 1566 Da Silva Rocha A.J., Gomes V., Van Ngan P., Passo M.J. de A.C.R., Fúria R.R. (2005)
1567 Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of
1568 salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **316**, 157-165.

- 1569 Fielder D.S., Bardsley W.J., Allan G.L. & Pankhurst P.M. (2005) The effects of salinity and
1570 temperature on growth and survival of Australina snapper, *Pagrus auratus*, larvae.
1571 *Aquaculture* **250**, 201-214.
- 1572 Fonseca Neto & Spach H. (1998/1999) Survival of juveniles of *Mugil platanus* Günther, 1880
1573 (Pisces, Mugilidae) in different salinities. *Boletim do Instituto de Pesca* **25**, 13-17.
- 1574 Galvão M.S.N., Yamanaka N., Fenerich-Verani N. & Pimentel C.M.M. (1997) Estudos
1575 preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunther,
1576 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Boletim do Instituto de*
1577 *Pesca* **24**, 101-110.
- 1578 Godinho H.M., Kavamoto E.T., Andrade-Talmelli E.F., Serralheiro P.C.S., Paiva P. & Ferraz
1579 E.M. (1993) Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Gunther, 1880, in Cananéia,
1580 São Paulo, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca* **20**, 59-66.
- 1581 Handeland S.O., Berge A., Bjornsson B.T., & Stefansson S.O. (1998) Effect of temperature and
1582 salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in
1583 seawater. *Aquaculture* **168**, 289-302.
- 1584 Herrera M., Vargas-Chacoff L., Hachero I., Ruíz-Jarabo I., Rodiles A., Navas J.I.N. & Mancera
1585 J.M. (2009) Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau,
1586 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research* **40**,
1587 762-771.
- 1588 Jensen M.K., Madsen S.S. & Kristiansen K. (1998) Osmoregulation ns salinity effects on
1589 expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in gills of European sea bass, *Dicentrarchus*
1590 *labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology* **282**, 290-300.

- 1591 Jobling M. (1994) *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London, 294p.
- 1592 Kantin R. & Baumgarten M.G.Z. (1982) Observações hidrográficas no estuário da Lagoa dos
1593 Patos: distribuição e flutuação dos sais nutrientes. *Atlântica* **5**, 76-92.
- 1594 Kim W.S., Kim J.M., Kim M.S., Park C.W. & Huh H.T. (1998) Effects of sudden changes in
1595 salinity on endogenous rhythms of spotted sea bass *Lateolabrax* sp. *Marine Biology* **131**,
1596 219-225.
- 1597 Kinne O. (1967) Physiology of estuarine organisms with especial reference to salinity and
1598 temperature: general aspects. In: *Estuaries* (ed. by G.H. Lauff). *American Association for*
1599 *the Advancement of Science Publication* **83**, 525-540.
- 1600 Laiz-Carrión R., Sangiao-Alvarellos S., Guzmán J.M., Río M.P.M., Soengas J.L. & Mancera
1601 J.M. (2005) Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different
1602 osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*
1603 **250**, 849-861.
- 1604 Lin Y.M., Chen C.N. & Lee T.H. (2003) The expression of Gill Na, K-ATPase in milkfish,
1605 *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comparative*
1606 *Biochemistry and Physiology A*, **135**, 489-497.
- 1607 Maçada A.P., Okamoto M.H. & Sampaio L.A. (2000) Avaliação preliminar do cultivo de tainha
1608 *Mugil platanus* em tanque-rede. In: *XIII Semana Nacional de Oceanografia (Anais)*, pp.
1609 684-686. Itajaí.
- 1610 Marshall W.S. (2002) Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and
1611 prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 264-283.

- 1612 Marshall W.S. & Grosell M. (2006) Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In:
 1613 *The Physiology of Fishes* (ed. by D.H. Evans & J.B. Claiborne), pp. 177-230. Taylor &
 1614 Francis, Boca Raton.
- 1615 McCormick S.D. (1995) Hormonal control of gill Na⁺, K⁺ -ATPase and chloride cell function.
 1616 In: *Cellular and Molecular Approaches to Fish Regulation*. (ed. by T.J. Shuttleworth &
 1617 C.M. Wood), pp. 285-315. Academic Press, San Diego.
- 1618 McCormick S.D (1993) Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-
 1619 ATPase activity. *Canadian Journal of Aquatic Sciences* **50**, 656-658.
- 1620 Menezes N.A., Oliveira C. & Nirchio M. (2010) An old taxonomic dilemma: the identity of the
 1621 western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*
 1622 **2519**, 59-68.
- 1623 Miranda Filho K., Tesser M.B., Sampaio L.A. & Godinho H.M. (2010) Tainha. In: *Espécies*
 1624 *Nativas para Piscicultura no Brasil* (ed. by B. Baldisserotto, L.C. Gomes), pp. 541-558.
 1625 Editora da UFSM, Santa Maria.
- 1626 Mommsen T.H., Vijayan M.M & Moon T.W. (1999) Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms
 1627 of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **9**, 211-268.
- 1628 Morgan J.D. & Iwama G.K. (1998) Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺, K⁺ -
 1629 ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. *Journal of Fish Biology* **53**, 1110-
 1630 1119.
- 1631 Morgan J.D & Iwama G.K. (1991) Effects of salinity on growth, metabolism and ion
 1632 regulation juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook

- 1633 salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic*
 1634 *Sciences* **48**, 2083-2094.
- 1635 Nordlie F.G. & Leffler C.W. (1975) Ion regulation and the energetic of osmoregulation in *Mugil*
 1636 *cephalus* Lin. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **51**, 125-131.
- 1637 Nordlie F.G., Szelistowski W.A., Nordlie W.C. (1982) Ontogenesis of osmotic regulation in
 1638 striped mullet, *Mugil cephalus* L. *Journal of Fish Biology* **20**, 79-86.
- 1639 Nordlie F.G. (2009). Environmental influences on regulation of blood plasma serum
 1640 components in teleost fish: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19**, 481-564.
- 1641 Okamoto M.H, Sampaio L.A. & Maçada A.O. (2006) Efeito da temperatura sobre o crescimento
 1642 e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880. *Atlântica* **28**, 61-66.
- 1643 Oliveira I.R. & Soares L.S.H. (1996) Alimentação da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880)
 1644 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim*
 1645 *do Instituto de Pesca* **23**, 95-104.
- 1646 Pérez-Robles J., Re A.D., Giffard-Mena I. & Díaz F. (2011) Interactive effects of salinity on
 1647 oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase
 1648 expression in bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture*
 1649 *Research* 1-12.
- 1650 Reis E.G. & D’Incao F. (2000). The present status of artisanal fisheries of extreme Southern
 1651 Brazil: an effort to wards community-based management. *Ocean & Coastal Management*
 1652 **43**, 585-595.

- 1653 Resley M.J., Webb Jr. K.A. & Holt G.J. (2006) Growth and survival of juvenile cobia,
 1654 *Rachycentron canadum*, at different salinities in recirculating aquaculture system.
 1655 *Aquaculture* **253**, 398-407.
- 1656 Sampaio L.A., Minillo A. & Ferreira A.H. (1998) Growth of juvenile mullet (*Mugil platanus*)
 1657 fed on different rations. In: *Aquicultura Brasil '98 (Anais 2)*, pp. 109-115. Recife.
- 1658 Sampaio A.L., Ferreira A.H. & Tesser M.B. (2001) Effect of stocking density on laboratory
 1659 rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günter, 1880). *Acta Scientiarum* **23**, 471-
 1660 475.
- 1661 Sampaio L.A. & Bianchini A. (2002) Salinity effects on osmoregulation and growth of the
 1662 euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology*
 1663 *and Ecology* **269**, 187-196.
- 1664 Sampaio L.A., Wasielesky Jr W., Miranda Filho K.C. (2002) Effect of salinity on acute toxicity
 1665 of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental*
 1666 *Contamination and Toxicology* **68**, 668-674.
- 1667 Sampaio L.A., Freitas L.S., Okamoto M.H., Louzada L.R., Rodrigues R.V. & Robaldo R.B.
 1668 (2007) Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from
 1669 fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* **262**, 340-346.
- 1670 Saoud I.P., Kreydiyyeh S., Chalfoun A. & Fakih M. (2007) Influence of salinity on survival,
 1671 growth, plasma osmolality and gill Na^+K^+ -ATPase activity in the rabbitfish *Siganus*
 1672 *rivulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **348**, 183-190.
- 1673 Skou J.C. (1988) The identification of sodium pump. *Bioscience Reports* **18**, 1-14.

- 1674 Tandler A., Anav F.A. & Choshniak I. (1995) The effect of salinity on growth rate, survival and
1675 swimbladder inflammation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture* **135**,
1676 343-353.
- 1677 Tsuzuki M.Y., Sugai J.K., Maciel J.C., Francisco C.J. & Cerqueira V.R. (2001) Survival,
1678 growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus*
1679 *parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture* **261**, 319-325.
- 1680 Urbinati E.C., Caneiro P.C.F. (2004) Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.
1681 In: *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva* (ed. by J.E.P.
1682 Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, N. Castegnolli, pp. 171-194. Editora TechArt,
1683 São Paulo.
- 1684 Vieira J.P., Castello J.P. & Pereira L.E. (1998) A ictiofauna. In: *Os ecossistemas Costeiro e*
1685 *Marinho do Extremo Sul do Brasil* (ed. by U. Seeliger, C. Odebrecht, J.P. Castello), pp.
1686 60-68. Editora Ecoscientia, Rio Grande.
- 1687 Woo Y.S. & Kelly S.P. (1995) Effects of nutritional status on growth and metabolism of *Sparus*
1688 *sarba* in closed seawater system. *Aquaculture* **135**, 229-238.
- 1689
- 1690
- 1691
- 1692
- 1693

1694 **Figure legends**

1695

1696 **Figure 1.** Gill Na⁺,K⁺-ATPase activity in juveniles of the lebranche mullet *Mugil liza*
1697 maintained at different salinities for 15 days. Values are expressed as mean ± standard error (n =
1698 6). Data were fitted using a non-linear regression analysis (polynomial; quadratic).

1699

1700 **Figure 2.** Liver glycogen content in juveniles of the lebranche mullet *Mugil liza*
1701 maintained at different salinities for 15 days. Values are expressed as mean ± standard
1702 error (n = 6). Data were fitted using non-linear regression analysis (polynomial;
1703 quadratic).

1704

1705

1706

1707

1708

1709

1710

1711

1712

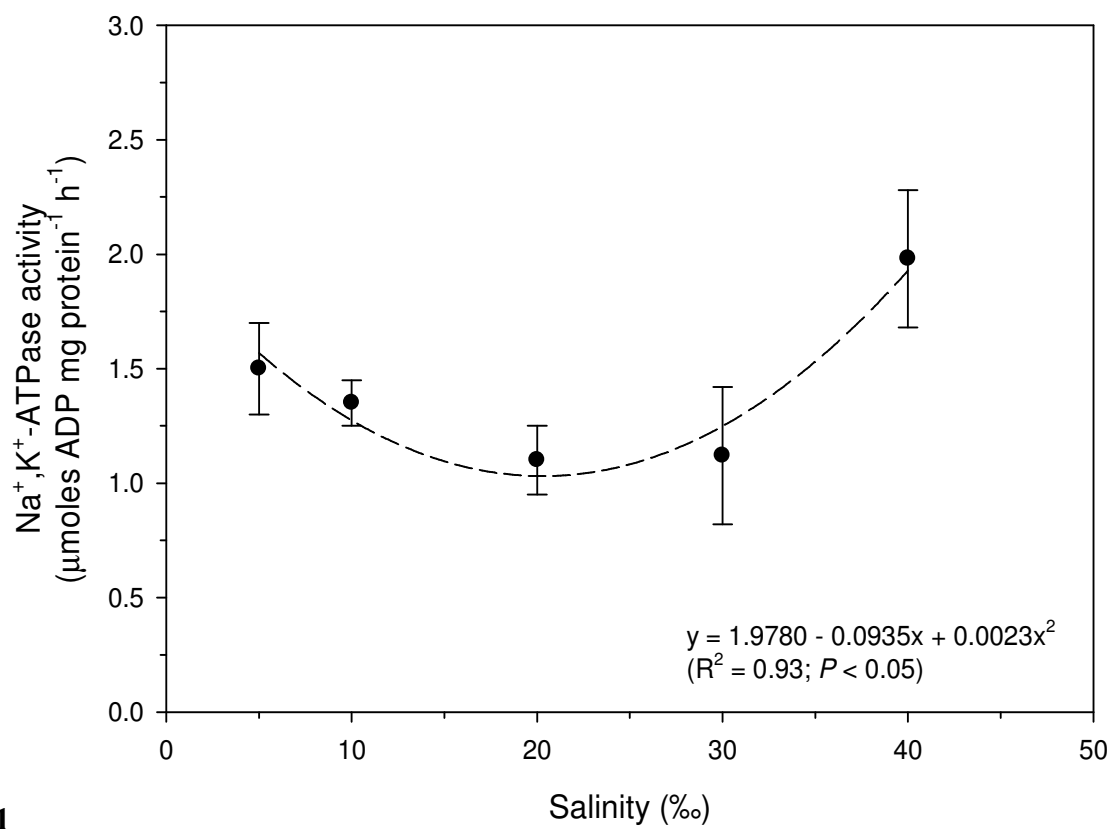
1713

Table 1. Water osmolality, blood osmolality and oxygen consumption of juvenile lebranche mullet *Mugil liza* maintained in different salinities for 15 days¹.

Salinity (‰)	Water osmolality (mOsm Kg ⁻¹)	Blood osmolality (mOsm Kg ⁻¹)	Oxygen consumption (mg O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)
5	168 ± 3.1	473.4 ± 41.4 [*]	0.36 ± 0.08
10	332 ± 4.7	330.0 ± 4.1	0.43 ± 0.03
20	565 ± 2.5	401.5 ± 11.8 [*]	0.38 ± 0.07
30	910 ± 5.2	467.4 ± 35.8 [*]	0.32 ± 0.05
40	1080 ± 3.5	414.4 ± 54.5 [*]	0.36 ± 0.07

¹ Data are expressed as mean ± standard error (n = 6). * indicates significant difference between water and blood osmolality for each experimental salinity ($P < 0.05$).

Figure



1719 1

1720

1721

1722

1723

1724

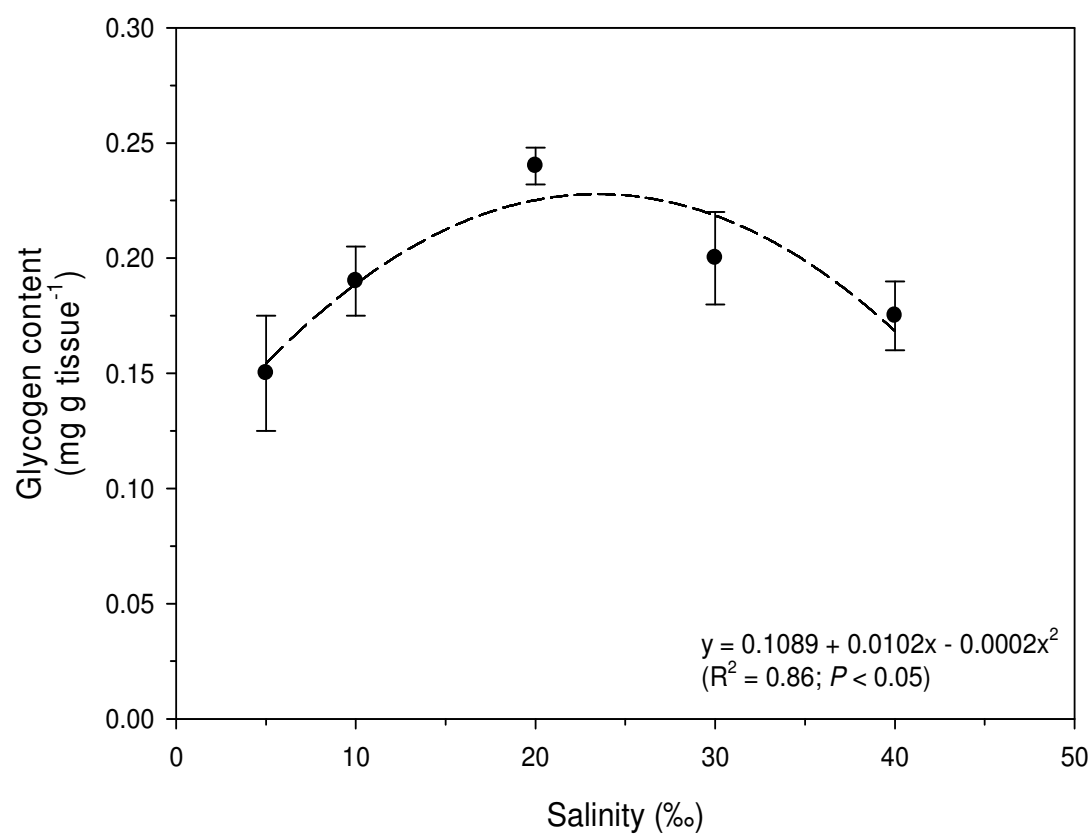
1725

1726

1727

1728

1729

Figure 2

1730

1731 **ANEXO II**

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738

1739

1740

1741

1742 Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch *Mugil*

1743 *liza*

1744

1745

1746

1747

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754 ¹ Artigo submetido a revista Aquaculture Research

1755 **Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch**

1756 *Mugil liza*

1757

1758 Viviana Lisboa da Cunha¹, Indianara Fernanda Barcarolli², Luís André Sampaio³ and Adalto

1759 Bianchini^{2*}

1760

1761 ¹Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Oceanografia, Programa de Pós-

1762 graduação em Oceanografia Biológica, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio

1763 Grande, RS, Brazil

1764

1765 ²Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália km 8,

1766 Campus Carreiros, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

1767 ³Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Oceanografia, Laboratório de

1768 Piscicultura Marinha, Rua do Hotel nº 02, 96203-900, Querência, Rio Grande, RS, Brazil

1769 *Corresponding author: Adalto Bianchini, Universidade Federal do Rio Grande - FURG,

1770 Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900, Rio Grande,

1771 RS, Brazil. Tel./Fax.: +55 53 3293 5193; e-mail: adaltobianchini@furg.br

1772

1773 Running title: salinity effect on mullet growth

1774 **Keywords:** glycogen, growth, mullet, Na⁺/K⁺-ATPase, salinity, oxygen consumption

1775 **Abstract**

1776 It has been hypothesized that energy cost involved in osmoregulation can be minimized
1777 when teleost fish are maintained under an isosmotic condition. It is also expected that the
1778 energy spared could improve fish growth. Therefore, the aim of the present study was to
1779 evaluate growth and metabolic performance of juveniles of the lebranche mullet *Mugil liza*
1780 reared for 40 days at different water salinities (0, 6, 12 and 24 ppt) corresponding to 0, 50, 100
1781 and 200% of the species isosmotic point (salinity 12‰). Tests were performed in quadruplicate
1782 using 30 fish per tank (0.48 ± 0.1 g wet body weight; 3.27 ± 0.1 cm total length). Water
1783 temperature and oxygen saturation were kept at $28.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and above 90%, respectively. Fish
1784 were fed with artificial diet (50% crude protein) four times a day until apparent satiation.
1785 Results showed that salinity influenced juvenile mullet growth. Fish reared at salinity 24 ppt
1786 grew better than those kept in fresh water (salinity 0). Gill $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ -ATPase activity and whole-
1787 body oxygen consumption showed an U-shape-type response over the range of salinities tested,
1788 with the lower values being observed at the intermediate salinities. In contrast, liver glycogen
1789 content tended to augment with increasing salinity, although no significant difference was
1790 observed among salinities. Taken altogether, these findings indicate that the energy demand for
1791 osmoregulation in juvenile *M. liza* can be minimized when fish are reared under isosmotic
1792 condition. However, the amount of energy saved seems not significant enough to improve
1793 juvenile mullet growth. They also suggest that *M. liza* is able to alternate between different
1794 energy-rich substrates during acclimation to water salinity.

1795

1796 1. Introduction

1797 Aquaculture seeks to provide an ideal and healthy environment in order to maximize
 1798 fish growth in a shorter period of time. Among environmental parameters affecting fish growth,
 1799 salinity is one of the most extensively studied, since it is a determinant factor for fish growth
 1800 (Jobling 1994; Boeuf & Payan 2001; Sampaio & Bianchini 2002; Nordlie 2009; Rodhy, Nissif
 1801 & Main 2010; Pérez-Robles, Giffard-Mena & Díaz 2011; O'Neill, Raedemaeker, McGrath &
 1802 Brophy 2011).

1803 Teleost fish are able to maintain ionic and osmotic homeostasis in their body fluids at
 1804 different environmental salinities through osmoregulatory mechanisms, which are energy
 1805 demanding processes (Sampaio & Bianchini 2002). In turn, growth is the net result from the
 1806 difference between the energy provided by food ingestion and the metabolic expenditure
 1807 (Jobling 1994). Considering that the osmoregulatory cost is proportional to the osmotic
 1808 gradient existing between the fish body fluids and the external medium (Handeland, Berge,
 1809 Bjornsson & Stefansson 1998), it is reasonable to expect that growth of fish reared in water with
 1810 salinity near its isosmotic environment will be maximized. In teleosts, the isosmotic point
 1811 generally corresponds to the water salinity of 12‰ (Woo & Kelly 1995; Boeuf & Payan 2001;
 1812 Sampaio & Bianchini 2002; Tsuzuki, Sugai, Maciel, Francisco & Cerqueira 2007; Herrera,
 1813 Vargas-Chacoff, Hachero, Ruíz-Jarabo, Rodiles, Navas & Mancera 2009; Nordlie 2009).
 1814 However, the significance of the energy spared under isosmotic conditions remains
 1815 controversial (Boeuf & Payan 2001; Kidder III, Petersen & Preston 2006). In addition, optimal
 1816 salinities for growth and metabolic rates are influenced by other factors including species and
 1817 developmental status (Morgan & Iwama, 1991).

1818 The metabolic energetic demand is met by energy-rich macronutrients such as
 1819 carbohydrates, lipids and proteins that can either be used directly as fuel (respiratory substrates)
 1820 or be stored within the body. Although lipid contain more energy, the preferably macronutrient
 1821 used as fuel by cells are carbohydrates like glucose, that can also be stored as glycogen (Jobling
 1822 1984). Although glucose is the main cellular metabolic energy source, under unfavorable
 1823 environmental conditions fish can change its metabolic energy production and utilization in
 1824 order to supplement/complement its energy supply by using other metabolic substrates (Tseng
 1825 & Hwang 2008).

1826 Euryaline fish can live in a wide range of environmental salinities due to their ability to
 1827 synthesize new salt-transporting proteins as the fish moves from salt to freshwater and vice
 1828 versa (Kidder III et al. 2006). Therefore, it is possible to use water from different sources to
 1829 develop the euryaline fish culture.

1830 The lebrance mullet *Mugil liza* is an euryaline species. It is an important resource
 1831 caught by fishermen in the Atlantic coast of Southern South America (Reis & D’Incao 2000)
 1832 and has a good acceptance in the market (Vieira 1985). Furthermore, its low position in the food
 1833 web (Oliveira & Soares 1996), ready acceptance of commercial diets and easy handling have
 1834 attracted the attention of fish farmers. Therefore, many studies have been developed to ascertain
 1835 its aquaculture potential. Briefly, studies conducted so far with this species were on artificial
 1836 fertilization (Godinho, Kavamoto, Andrade-Talmelli, Serralheira, Paiva & Ferraz 1993),
 1837 larviculture (Galvão, Yamanaka, Fenerich-Verani & Pimentel 1997), feeding ration (Sampaio,
 1838 Minillo & Ferreira 1998), optimal stocking density (Sampaio, Ferreira & Tesser 2001), optimal
 1839 temperature (Okamoto, Sampaio & Maçada 2006), and protein requirement (Carvalho ,
 1840 Bianchini, Tesser & Sampaio 2010). Specifically on salinity, it is known that juveniles directly
 1841 transferred from salt water (30‰) to dilute salinities down to 5‰ do not induce any mortality

1842 after 96 h of transference (Fonseca Neto and Spach (1998/1999). It is also known that ammonia
1843 and nitrite toxicity is minimized at intermediate and high salinities, when compared to that
1844 observed in juvenile kept in fresh water (Sampaio, Wasielesky Jr. & Miranda Filho 2002).
1845 However, little is known about the effect of salinity on juvenile lebranche growth.

1846 In light of the background described above, the main objective of the present study was
1847 to evaluate the effect of water salinity on survival, growth, total apparent food consumption,
1848 feed efficiency (FE), Fulton coefficient (FC), gill Na^+,K^+ -ATPase activity (NKA), whole-body
1849 oxygen consumption rate (OCR) and liver glycogen content in juvenile mullet *M. liza*. Water
1850 salinities tested corresponded to 0, 50, 100 and 200‰ of that described as being isosmotic with
1851 the body fluids of the studied species.

1852

1853 2. Materials and Methods

1854

1855 2.1. Fish acclimation and experimental design

1856

1857 Juvenile *M. liza* were captured at Cassino Beach (Southern Brazil) and transferred to our
1858 Laboratory of Marine Fish Culture. Acclimation was made in two 1,000-L tanks containing
1859 fresh water at 25°C. Room photoperiod was set at 14L:10D. Fish were fed four times a day
1860 (9:00, 13:00, 17:00 and 21:00 h) with a commercial diet (NRD 50% crude protein, INVE) until
1861 apparent satiation. These conditions were also maintained during the experimental period. Fish
1862 feces were siphoned out once daily, when at least 50% of the water was renewed.

After a 20-days period of acclimation, 480 fish (body wet weight: 0.48 ± 0.01 g; total length: 3.27 ± 0.01 cm) were randomly stocked in 16 tanks (50 L). Tanks were kept using recirculating aquaculture systems, equipped with mechanical and biological filters, UV sterilization, and temperature controllers. Experimental salinities tested were 0, 6, 12 and 24‰, which corresponds to 0, 50, 100 and 200% of the isosmotic salinity for most teleost fish. Acclimation to the experimental salinity was performed by a daily increase in 6 units of water salinity from 0 up to 24‰. Experimental salinities were obtained by a mixture of dechlorinated tap water with natural sea water. Dissolved oxygen concentration, water temperature (oxymeter YSI Model), salinity (refractometer, Atago), pH (pH meter, Quimis) and total ammonia (APHA, 2005) were measured daily over the 40-days experimental period.

2.2 Survival, growth and zootechnical parameters

Fish survival (S) was expressed as percentage of total fish tested according to the following equation: $S = [(N_i - N_f)/N_i] \times 100$, where N_i is the number of fish stocked in the tank at the beginning of the experiment and N_f corresponds to the number of living fish after 48 h of experiment.

All fish were weighed every 20 days using an electronic balance (to the nearest 0.01 g). Feeding was stopped 24 h before fish weight measurement. Specific growth rate (G) was expressed in percentage and calculated according to the following equation: $G = [(\ln W_f - \ln W_i)/T] \times 100$, where W_f and W_i is the fish body mass at the beginning and the end of the experiment, respectively.

1885 Feed efficiency (FE) was calculated based on the following equation: $FE = (BG/DFO)$,
 1886 where BG is the biomass gain (g) and DFO is the dry feed offered (g).

1887 Weight coefficient variation (WCV) was calculated using the following expression:
 1888 $WCV = (SD/MW) \times 100$, where SD is the standard deviation and MW is the mean weight (g).

1889 Condition factor (CF) was calculated using the following equation: $CF = (BW/L^3)$,
 1890 where BW is the body weight (g) and L is the fish length (cm).

1891

1892 2.3 Whole-body oxygen consumption

1893

1894 At the end of the 40-days experimental period, whole-body oxygen consumption was
 1895 measured following procedures described by Cunha, Rodrigues, Okamoto and Sampaio (2009).
 1896 The oxygen concentration in the water was recorded every 15 min with an oximeter (YSI model
 1897 Hexis 55) until it dropped to 70 % of the oxygen saturation to avoid a possible influence on the
 1898 oxygen saturation level on fish oxygen consumption. Oxygen consumption rate (OCR) was
 1899 calculated using the following equation: $OCR = [(O_i - O_f) \times V / (T \times B)]$, where O_i and O_f correspond
 1900 to the water oxygen content ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) at the beginning and the end of the measurement
 1901 period, respectively; V is the tank volume (L); B is the fish biomass (g) and T is the
 1902 measurement duration (h). Results were expressed in $\text{mg O}_2 \text{ g wet body mass}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

1903

1904 2.4 Tissue sample collection and biochemical analyses

1905

1906 After the oxygen measurement, fish were anesthetized (50 ppm benzocain) and immediately
 1907 killed by spinal section. The second gill arch, at the left side, and liver were immediately
 1908 dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further measurement of gill NKA
 1909 and liver glycogen content, as described below.

1910 Gills were homogenized in 300 µl of cold buffer (pH 7.3) containing 150 mM sucrose, 10
 1911 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mM imidazole, and 11.5 mM sodium deoxycholate,
 1912 and centrifuged at 10,000 x g for 30 s (4°C). The supernatant was used for NKA measurement
 1913 following the protocol described by McCormick (1993). Sample absorbance was measured
 1914 using a spectrophotometer (ELX 800 Universal Microplate Reader/Bio-Teck Instruments,
 1915 Winooski, Vermont, USA). The protein concentration in the supernatant was determined using a
 1916 commercial reagent kit based on the Biuret reagent (Doles, Goiânia, GO, Brazil). Enzyme
 1917 activity was expressed in µmoles ADP mg protein⁻¹ h⁻¹.

1918 Liver samples were weighed and homogenized in 100 mM sodium citrate solution (10%
 1919 weight/volume). Glycogen concentration was determined using an adaptation of the method
 1920 described by Carr and Neff (1984). In this case, glucose concentration in the samples was
 1921 measured using a commercial reagent kit based on the glucose-oxidase method (Doles, Goiânia,
 1922 GO, Brazil). Sample absorbance was measured using a spectrophotometer (ELX 800 Universal
 1923 Microplate Reader/Bio-Teck Instruments, Winooski, Vermont, USA). Results were expressed in
 1924 mg g wet tissue⁻¹.

1925

1926 *2.5 Data presentation analysis*

1927

Results were expressed as mean $\pm$ standard error. Mean values were compared using One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Mean values were considered significantly different when $P < 0.05$. Correlation between OCR and NKA was evaluated using the Pearson correlation index (R).

3. Results

During the experimental period, mean water temperature and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration did not differ among treatments. Mean values corresponded to $28.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and $0.02 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$, respectively, while oxygen saturation remained above 90% saturation ($p > 0.05$). Mean water pH was similar among salinities 6, 12 and 24‰ (general mean = 8.20 ± 0.02) ($p > 0.05$), but higher than in fresh water (6.93 ± 0.01) ($p < 0.05$).

There was no effect of water salinity on fish survival, which was close to 100% in all treatments ($p > 0.05$). Fish weight, length, and SGR were significantly affected by water salinity. They increased with increasing salinity, being significantly higher in salinity 24‰ than in fresh water ($p < 0.05$). However, CF was similar in all salinities ($p > 0.05$) (Table 1). Also, FE, total apparent food consumption, gill NKA, OCR, and liver glycogen content did not differ among salinities ($p > 0.05$). However, it is important to note that mean values of NKA showed the “U-shaped” type response across the range of salinities tested, being lower near the isosmotic salinity (6-12 ppt) and higher at the extremities salinities tested (0 and 24 ppt) (Fig. 1). OCR followed a similar pattern to that described for gill NKA (Fig. 2). In fact, a significant and positive correlation was observed between gill NKA and OCR ($\text{OCR} = 0.049 + 0.119 \times \text{NKA}$; R

1950 = 0.942). Also, no significant difference was observed in liver glycogen content among
 1951 salinities. However, a tendency of increase was observed with increasing salinity (Fig. 3).

1952

1953 4. Discussion

1954

1955 The main question addressed in the present study was to assess how significant would be
 1956 the impact of the energy demand associated with osmoregulation on growth performance of
 1957 juvenile mullet *M. liza*. In general, fish held in hypo or hyperosmotic environments would show
 1958 additional energy requirements for osmoregulation that could hamper growth when compared to
 1959 those kept at an isosmotic environment (Woo & Kelly 1995; Boeuf & Payan 2001; Sampaio &
 1960 Bianchini 2002; Tsuzuki et al. 2007; Tseng & Hwang 2008; Herrera et al. 2009; Pérez-Robles et
 1961 al. 2011). It is important to note that the energy cost associated with osmoregulation may vary at
 1962 the different ontogenetic developmental stages. Also, response to salinity has shown to be
 1963 highly variable among fish species. This variation is likely associated with the interaction
 1964 between osmoregulatory mechanisms with other physiological processes (Jobling 1994;
 1965 Imsland, Bonga, Ham & Stefansson 2002) and fish ecology (O'Neill et al. 2011).

1966 Among all growth performance indexes and biochemical parameters analyzed in the
 1967 juvenile mullet *M. liza* only growth measured as wet body mass was affected by water salinity.
 1968 Furthermore, a significant difference among treatments was observed only between fish
 1969 acclimated to fresh water and those maintained in the higher water salinity tested (24 ppt).

1970 As the mullet *M. liza*, the flatfish *Paralichthys orbignyanus* is also an euryaline species
 1971 showing reduced growth in fresh water (Sampaio & Bianchini 2002). According to these

1972 authors, the lower growth in such environment is a result of an increased gill NKA activity and
 1973 consequently higher energy expenditure associated with osmoregulation. In fact, the
 1974 osmoregulatory energy demand is usually directly correlated to gill NKA (Laiz-Carrión et al.
 1975 200). In turn, OCR is often used to estimate the metabolic status of fish subjected to different
 1976 water salinities (Kim et al. 1998; Sampaio & Bianchini 2002; Da Silva Rocha, Gomes, Van
 1977 Ngan, Passo & Fúria 2005). It is important to note that OCR was significantly and positively
 1978 correlated with the gill NKA in juvenile *M. liza* over the range of salinities tested. In the
 1979 metabolic context, this finding clearly indicate that the osmotic comfort zone for juvenile *M.*
 1980 *liza* corresponds to water salinities in or around the isosmotic environmental condition.
 1981 Actually, the response of gill NKA observed in juvenile *M. liza* in the range of salinities tested
 1982 corresponds to the “U-shaped” marine euryhaline model reported by Jensen, Madsen and
 1983 Kristiansen (1998), Boeuf and Payan (2001) and Varsamos, Nebel & Charmantier (2002).
 1984 Jensen et al. (1998) highlighted that this pattern could represent an adaptive mechanism to
 1985 improve the energy use since it allows fish to maintain a low gill NKA when facing a wide
 1986 salinity gradient.

1987 In light of the discussed above, the lower growth observed in juvenile *M. liza* maintained
 1988 in fresh water seems to be related to a higher energy cost associated with osmoregulation in
 1989 fresh water than in salt water (24 ppt). Although no significant difference was observed in gill
 1990 NKA, OCR and liver glycogen content among salinities, the trends of higher gill NKA and
 1991 OCR combined with the trend of a lower liver glycogen content observed in fish maintained in
 1992 fresh water supports this idea. However, it is possible that the observed difference in growth is
 1993 likely caused by a combination of increased energy demand for osmoregulation combined with
 1994 that to maintain other physiological process. This statement is based on the fact that trends of
 1995 increase in gill NKA and OCR were also observed in juvenile *M. liza* maintained in the higher

1996 salinity tested (24 ppt), but no decrease in liver glycogen content was observed. In this osmotic
 1997 condition, an even trend of increase in liver glycogen content was noted. The possible use of an
 1998 alternative source of energy than carbohydrates by fish maintained in fresh water, as discussed
 1999 below, cannot be ruled out.

2000 In fish, plasma glucose level necessary to meet the metabolic energy requirement can be
 2001 maintained based on glycogen reserves (Baldiasserotto et al. 2007; Pérez-Robles et al. 2011).
 2002 However, stress induced by changes in water salinity can induce alterations in metabolic energy
 2003 production and utilization. Therefore, energy supply during acclimation to environmental
 2004 salinity can be fulfilled by other metabolic substrates than carbohydrates, such as proteins and
 2005 lipids (Tseng et al. 2008). In fact, Woo and Kelly (1995) reported that the growth improvement
 2006 observed in *Sparus sarba* at the isosmotic salinity could be assigned to either a reduction in
 2007 metabolism when fish is maintained under an isosmotic condition or a metabolic reorganization
 2008 in order to prioritize the use of carbohydrates and lipids while proteins are spared and used for
 2009 growth.

2010 The “U-shaped” pattern observed for gill NKA and OCR over the range of salinities
 2011 tested indicates the energy demand associated with osmoregulation is reduced at intermediate
 2012 salinities. Therefore, it would be expected that liver glycogen content could be higher under this
 2013 osmotic condition if only carbohydrates were being used to fulfill the energy demand associated
 2014 with osmoregulation. However, the higher content of liver glycogen was observed in juvenile
 2015 *M. liza* maintained at the higher salinity tested (24 ppt). This finding clearly indicates that the
 2016 additional energy demand imposed by exposure to high salinity is being supplied, at least in
 2017 part, by other energy substrates than liver glycogen. In fact, Cafsi et al. (2003) reported that
 2018 lipid is also important source of energy during salinity acclimation in the mullet *M. cephalus*.
 2019 Therefore, it seems that *M. liza* is able to reorganize its metabolism in order to prioritize the

2020 metabolic use alternative energy-rich substrates like proteins or lipids when exposed to 24 ppt,
 2021 as already reported for other euryhaline fish (Woo & Kelly 1995; Tseng et al. 2008).
 2022 Considering the facts that *M. liza* is an iliophagus fish (Oliveira & Soares 1996) and that the
 2023 optimal dietary level of proteins required by this fish corresponds to 35% crude protein
 2024 (Carvalho et al. 2010), no protein shortage for fish growth would be expected to occur since the
 2025 feed employed in the present study had 50% crude protein.

2026 Although growth was significantly affected only in fresh water, it is important to note that
 2027 the best mean increment in growth was observed when juvenile *M. liza* was maintained in a
 2028 water salinity corresponding to the double of the relative value considered as isosmotic for
 2029 teleost fish. This finding clearly indicates that the isosmotic salinity is not necessarily the
 2030 optimal condition for fish growth, as previously reported for other marine fish (O'Neill et al.
 2031 2011). Despite that a lower growth performance of juvenile *M. liza* was observed in fresh water,
 2032 the result obtained was better than that found for other Brazilian marine fish such as the fat
 2033 snook *Centropomus parallelus* (Tsuzuki et al. 2001), the flatfish *P. orbignyanus* (Sampaio and
 2034 Bianchini 2002) and the cobia *Rachycentron canadum* (Resley, Webb Jr. & Holt 2006) under
 2035 similar experimental conditions.

2036 Finally, it is important to note that the mullet *M. liza* is a catadromous species spawning
 2037 in open sea, with juveniles smaller than 5.0 cm being usually being recruited to the estuary
 2038 (Menezes & Figueiredo 1985; Vieira 1991). Considering that *M. liza* is an euryhaline species of
 2039 marine origin, it is reasonable to suggest that fresh water can disturb the development of fries
 2040 and juveniles of *M. liza* smaller than 5.0 cm. In this context, it is worth to mention that fish can
 2041 choose its preferential ambient not necessarily based upon the metabolic advantage associated
 2042 with the isosmotic condition but also considering food competition and predation (O'Neill et al.
 2043 2011; Halpin 2000). Therefore, a fish preference for estuarine areas can be considered in this

context, as they provide adequate protection and food availability while showing highly variability in their physicochemical conditions, including salinity.

In conclusion, data reported in the present study show that energy demand for osmoregulation in juvenile *M. liza* can be minimized in water salinity close to the isosmotic conditions. However, the amount of energy spared under this condition is not enough to improve growth in juvenile mullets. They also suggest that *M. liza* is able to alternate the use of energy-rich substrates according to the environmental salinity.

5. Acknowledgments

V.L. Cunha is a PhD fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil). L.A. Sampaio and A. Bianchini are research fellows from the Brazilian CNPq. A. Bianchini is also supported by the International Canadian Research Chair Program (International Development Research Centre, Ottawa, Canada).

6. References

APHA (2005) *Standard Methods for examination of Water and Wastewater*, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC. 1193pp.

- 2064 Baldisserotto B., Romero J.M.M. & Kapoor B.G. (2007) *Fish Osmoregulation*, Science
2065 Publishers, New Hampshire. 527p.
- 2066 Boeuf G. & Payan P. (2001) How should salinity influence fish growth? *Comparative*
2067 *Biochemistry and Physiology C* **130**, 411–423.
- 2068 Carvalho C.V.A., Bianchini A., Tesser M. & Sampaio L.A (2010) The effect of protein levels
2069 on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus*
2070 (Gunther). *Aquaculture Research* **41**, 511-518.
- 2071 Cunha V.L, Rodrigues R.V., Okamoto M.H. & Sampaio L.A (2009) Consumo de oxigênio pós-
2072 prandial de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural* **49** (4), 1257-1259.
- 2073 Da Silva Rocha A.J., Gomes V., Van Ngan P., Passo M.J. de A.C.R. & Fúria R.R. (2005)
2074 Metabolic demand and growth of juvenile of *Centropomus parallelus* as function of
2075 salinity. *Journal of experimental Marine and Biology Ecology* **316**, 157-165.
- 2076 Fonseca Neto & Spach (1998/1999) Survival of juveniles of *Mugil platanus* Günther, 1880
2077 (Pisces, Mugilidae) in different salinities. *Boletim do Instituto de Pesca* **25**, 13-17.
- 2078 Galvão M.S.N, Yamanaka N., Fenerich-Verani N., Pimentel C.M.M. (1997) Preliminary studies
2079 on proteolytic digestive enzymes in the larval and juvenile stages of the mullet *Mugil*
2080 *platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae). *Boletim do Instituto de Pesca* **24**, 101-
2081 110.
- 2082 Godinho H.M., Kavamoto E.T., Andrade-Talmelli E.F., Serralheiro P.C.S., Paiva P. & Ferraz
2083 E.M. (1993) Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, in
2084 Cananéia, São Paulo, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca* **20**, 59-66.

- 2085 Halpin, P.M. (2000) Habitat use by intertidal salt-marsh fish: trade-offs between predation and
2086 growth. *Marine Ecology Progress Series* **198**, 203-214.
- 2087 Handeland S.O., Berge A., Bjornsson B.Th. & Stefansson S.O. (1998) Effect of temperature and
2088 salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in
2089 seawater. *Aquaculture* **168**, 289-302.
- 2090 Herrera M., Vargas-Chacoff L., Hachero I., Ruíz-Jarabo I., Rodiles A., Navas J.I.N. & Mancera
2091 J.M. (2009) Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau,
2092 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research* **40**,
2093 762-771.
- 2094 Imsland A.K, Foss A., Bonga S.W., Ham E.V. & Stefansson S.O. (2002) Comparison of growth
2095 and RNA: DNA ratios in three populations of juvenile turbot reared at two salinities.
2096 *Journal of Fish Biology* **60**, 288-300.
- 2097 Jensen M.K. Madsen S.S. & Kristiansen K. (1998) Osmoregulation and salinity effects on the
2098 expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gill of european sea bass *Dicentrarchus*
2099 *labrax* (L.). *The Journal of Experimental Zoology* **282**, 290-300.
- 2100 Jobling M. (1994) *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London. 294p.
- 2101 Kidder III G.W., Petersen C.W & Preston R.L. (2006) Energetics of osmoregulation: II. Water
2102 flux and osmoregulatory work in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of*
2103 *Experimental Zoology A* **305**, 318-327.
- 2104 Laiz-Carrión R., Sagiao-Alvarellos, Guzmán J.M., Del Río M.P.M., Soengas J.L. & Mancera
2105 J.M. (2005) Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different

- 2106 osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*
 2107 **250**, 849-861.
- 2108 McCormick S.D (1993) Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺ -
 2109 ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 656-658.
- 2110 Menezes A.N. & Figueiredo J.L. (1985) *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil V.*
 2111 *Teleostei (4)*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 105p.
- 2112 Menezes N.A., Oliveira C. & Nirchio M. (2010) An old taxonomic dilemma: the identity of the
 2113 western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*,
 2114 **2519**, 59-68.
- 2115 Morgan J.D & Iwama G.K (1991) Effects of salinity on growth, metabolism and ion regulation
 2116 juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon
 2117 (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**,
 2118 2083-2094.
- 2119 Nordlie, F.G. 2009. Environmental influences on regulation of blood plasma serum components
 2120 in teleost fish: a review. *Review in Fish Biology and Fisheries* **19**, 481-564.
- 2121 Okamoto M.H, Sampaio L.A & Maçada A.O. (2006) Efeito da temperatura sobre o crescimento
 2122 e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880. *Atlântica* **28**, 61-66.
- 2123 Oliveira I.R & Soares L.S.H. (1996) Alimentação da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880)
 2124 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim*
 2125 *do Instituto de Pesca* **23**, 95-104.

- 2126 O'Neill B., Raedemaeker F.De, McGrath D. & Brophy D. (2011) An experimental
 2127 investigation of salinity effects on growth, development and condition in European
 2128 flounder (*Platichthys flesus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*
 2129 **410**, 39-44.
- 2130 Pérez-Robles J., Re A.D., Giffard-Mena I. & Díaz F. (2011) Interactive effects of salinity on
 2131 oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase
 2132 expression in bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture*
 2133 *Research* **43** 1372-1383.
- 2134 Reis E.G. & Incao F.D' (2000). The present status of artisanal fisheries of extreme Southern
 2135 Brazil: an effort to wards community-based management. *Ocean & Coastal Management*
 2136 **43**, 585-595.
- 2137 Resley J.M., Webb Jr. K.A., Holt G.J (2006) Growth and survival of juvenile cobia,
 2138 *Rachycentron canadum*, at different salinities in recirculating aquaculture system.
 2139 *Aquaculture* **253**, 398-407.
- 2140 Rodhy N.R., Nissif N.A. & Main K.L. (2010) Effects of salinity on growth and survival of
 2141 common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) larvae. *Aquaculture Research*
 2142 **41**, 357-360.
- 2143 Sampaio L.A., Minillo A. & Ferreira A.H. (1998) Growth of juvenile mullet (*Mugil platanus*)
 2144 fed on different rations. In: *Aquicultura Brasil '98 (Anais)*, Recife, **2**, 109-115.
- 2145 Sampaio A.L., Ferreira A.H. & Tesser M.B (2001) Effect of stocking density on laboratory
 2146 rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günter, 1880). *Acta Scientiarum* **23**, 471-
 2147 475.

- 2148 Sampaio L.A. & Bianchini A. (2002) Salinity effects on osmoregulation and growth of the
2149 euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology*
2150 *and Ecology* **269**, 187-196.
- 2151 Sampaio L.A., Wasielesky Jr W., Miranda Filho K.C. (2002) Effect of salinity on acute toxicity
2152 of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental*
2153 *Contamination and Toxicology* **68**, 668-674.
- 2154 Skou J.C. (1988) The identification of sodium pump. *Bioscience Reports* **18**, 1-14.
- 2155 Tseng Y-C & Hwang P-P (2008) Some insights into energy metabolism for osmoregulation in
2156 fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **148**, 419-429.
- 2157 Tsuzuki M.Y., Sugai, J.K., Maciel, Francisco. C.J. & Cerqueira, V.R. (2001) Survival, growth
2158 and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*)
2159 reared at different salinities. *Aquaculture* **261**, 319-325.
- 2160 Varsamos S., Nebel C. & Charmantier G. (2005) Ontogeny of osmoregulation in postembryonic
2161 fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **141**, 401-429.
- 2162 Vieira J.P. (1991) Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS,
2163 Brazil. *Copeia* **2**, 409-418.
- 2164 Woo N.Y.S. & Kelly S.P. (1995) Effects of salinity and nutritional status on growth and
2165 metabolism of *Sparus sarba* in closed seawater system. *Aquaculture* **135**, 229-238.
- 2166

2167 **Figure legends**

2168

2169 **Figure 1.** Gill Na⁺- K⁺- ATPase activity in juvenile lebranche *Mugil liza* after acclimation to
2170 different salinities for 40 days. Data are mean ± standard error (n=6).

2171

2172 **Figure 2.** Whole-body oxygen consumption in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* after
2173 acclimation to different salinities for 40 days. Data are mean ± standard error (n=6).

2174

2175 **Figure 3.** Liver glycogen content in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* after acclimation to
2176 different salinities for 40 days. Data are mean ± standard error (n=6).

2177

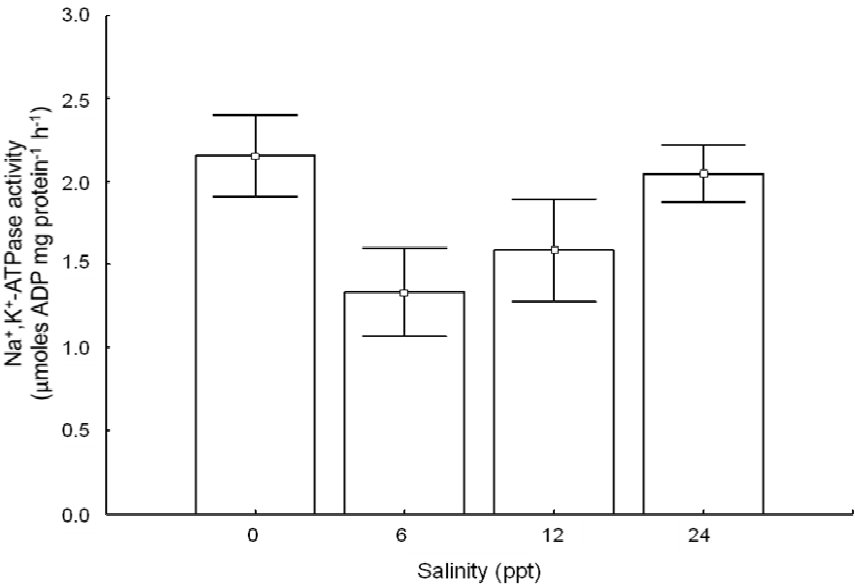
Table 1. Body weight, weight coefficient variation (CV) specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE) and Fulton coefficient (FC) in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* maintained in different salinities for 40 days¹.

Parameter	Salinity (ppt)			
	0	6	12	24
Initial body weight (g)	0.48 ± 0.00	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0.00	0.49 ± 0.01
Final body weight (g)	6.16 ± 0.17 ^a	6.50 ± 0.12 ^{ab}	6.77 ± 0.08 ^b	7.22 ± 0.05 ^b
CV	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01
SGR (g/day)	6.39 ± 0.06 ^a	6.44 ± 0.07 ^{ab}	6.762 ± 0.06 ^{ab}	6.78 ± 0.07 ^b
FE (gain/g dry feed)	0.79 ± 0.04	0.80 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.80 ± 0.03
FC	2.36 ± 0.07	2.44 ± 0.03	2.51 ± 0.02	2.62 ± 0.02

¹ Data are expressed as mean ± standard error (n = 20). * Different letters denote significant difference among treatments (P < 0.05).

2185

Figure 1

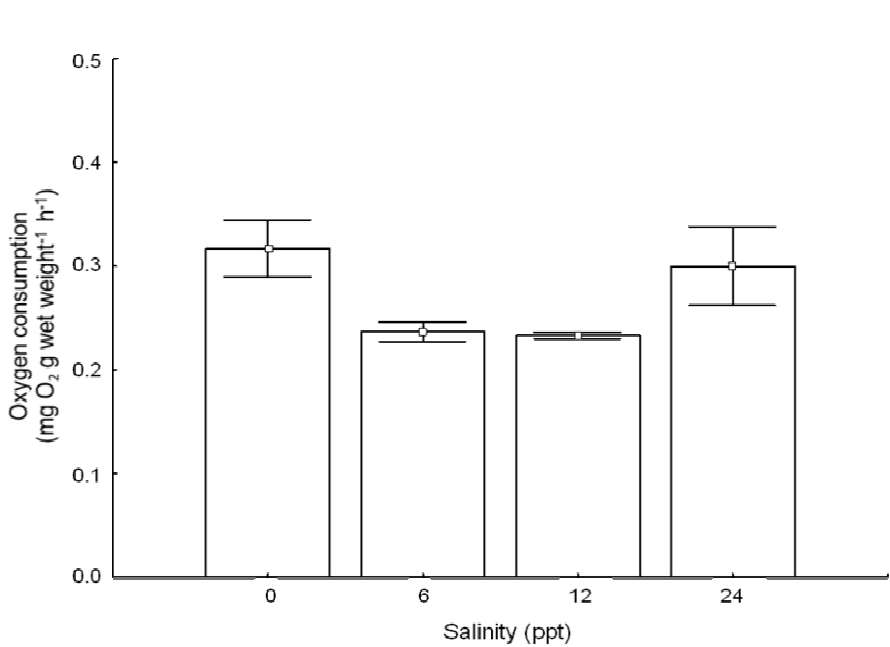


2186

2187

2188

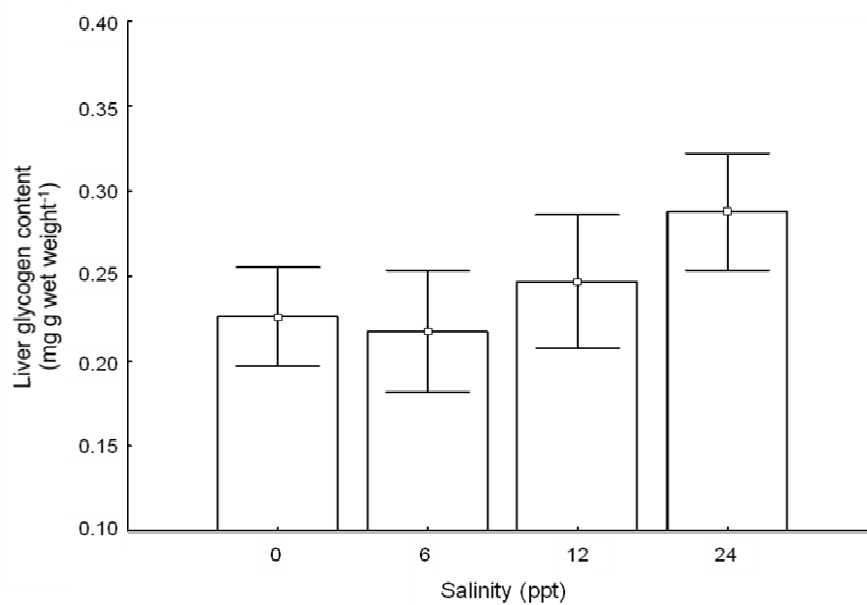
Figure 2



2189

2190

Figure 3



2207 **ANEXO III**

2208

2209

2210

2211

2212

2213

2214

2215

2216

2217 Dietary Salt Supplementation for Juvenile Lebranche Mullet *Mugil liza* Reared in

2218 Freshwater

2219

2220

2221

2222

2223

2224

2225

2226

2227

2228

2229

2230 ¹ Artigo no formato de submissão para revista Fish Physiology and Biochemistry.

2231 **Dietary Salt Supplementation for Juvenile Lebranche Mullet *Mugil liza* Reared in**
2232 **Freshwater**

2233

2234 Viviana Lisboa da Cunha¹, Indiana Barcarolli¹, Luís André Sampaio² and Adalto
2235 Bianchini¹.

2236

2237 ¹ Federal University of Rio Grande (FURG), Institute of Oceanography, Program of
2238 Biological Oceanography, Institute of Biological Science, CP 474, 96201-900 – Rio
2239 Grande – RS – Brasil. E-mail: viviana_aquicultura@yahoo.com.br,
2240 adaltobianchini@furg.br, barcarolli@gmail.com

2241

2242 ² Federal University of Rio Grande (FURG), Institute of Oceanography, Program of
2243 Aquaculture, Laboratory of Marine Fish Culture, Rio Grande - RS, CP 474, CEP 96201-
2244 900, Brazil. E-mail: sampaio@mikrus.com.br

2245

2246

2247 **Abstract**

2248 The use of dietary salt supplementation for marine/estuarine fish reared in low
2249 salinities and/or freshwater is being adopted to increase aquaculture performance of
2250 these species. The lebranche mullet *Mugil liza* is euryhaline and can be reared in
2251 freshwater. The aim of this study was to evaluate the zootechnical and physiological
2252 performance of juvenile mullet fed on diets supplemented with four levels of NaCl over
2253 45 days in freshwater. Salt (Na⁺) content in the diets was determined by an atomic
2254 absorption spectrophotometer and they were equal to 0.9, 5.4, 8.0, and 13.2% salt
2255 supplementation (SS). A total of 240 fish (weight 4.5 ± 0.07 g and length 7.41 ± 0.03 cm)
2256 were randomly distributed into 16 tanks (50L) maintained in a RAS equipped with
2257 mechanical and biological filter, plus temperature controller and an UV sterilizer.
2258 Temperature was maintained at 27 °C, oxygen saturation above 89% and photoperiod
2259 was 14L:10D. Fish were fed on the experimental diets three times per day until apparent
2260 satiation. Survival, feed efficiency (FE) and liver glycogen concentration were similar
2261 among treatments ($p>0.05$). However, specific growth rate (SGR), apparent food
2262 consumption (AFC), and Fulton's Condition Factor decreased as the salt content of the
2263 diets increased ($p<0.05$). Na⁺ content above 5.4% hampered fish growth, while SGR,
2264 AFC and gill Na⁺- K⁺- ATPase were lower specifically at 13.2% SS ($p<0.05$). The lack
2265 of difference in FE among treatments associated to the lower SGR, lower AFC and the
2266 higher gill Na⁺- K⁺- ATPase activity at 13.2% SS can be a consequence of poorer
2267 palatability of the diet and the increased salt secretion due to the high dietary salt
2268 content. Finally, juvenile mullet fed a diet containing up to 5.4% SS show positive

2269 zootechnical and physiological responses compared to mullet fed diets with higher salt
2270 content. However, the best dietary Na⁺ level corresponds to 2.6%.

2271 **Key-words: Salt supplementation, osmoregulation, freshwater.**

2272 **Introduction**

2273 Mulletts, especially the flathead grey mullet *Mugil cephalus*, have been produced
2274 in different countries such as Egypt, Korea, Taiwan and India (FAO 2010), where they
2275 are reared in low salinity waters (Cardona, 2000; Khériji et al. 2003).

2276 The lebranche mullet *Mugil liza* occur from Florida (EUA) to the South Western
2277 Coast of the Atlantic Ocean (Fischer et al. 2011; Miranda Filho et al. 2012). The
2278 juveniles of this estuarine-dependent species (Bemvenuti and Oliveira 2006) inhabit the
2279 estuary until they reach sexual maturity, when they migrate towards the sea to
2280 reproduce (Menezes and Figueiredo 1985; Vieira 1991). This species is an important
2281 item for estuarine and coastal fisheries in Southern Brazil (Vieira 1985; Reis & D’Incao
2282 2000) and has aroused interest as aquaculture candidate.

2283 Characteristics of lebranche mullet, such as its omnivorous feeding strategy, and
2284 consequently, the low dietary protein requirement (Oliveira and Soares 1996; Carvalho
2285 et al. 2001), the high tolerance to ammonia, nitrite, and nitrate concentrations (Miranda-
2286 Filho et al. 1995; Sampaio et al. 2002; Poersh et al. 2007), and the wide range of
2287 tolerance to temperature (Okamoto et al. 2006) and salinity (Fonseca and Spach
2288 1998/1999), make it a species with good potential for aquaculture proposes. Besides,

2289 juvenile mullet easily show adaptation to captivity, evidenced by the readily acceptance
 2290 of artificial diets enable its production in lakes, reservoirs, ponds or cages in mono or
 2291 policulture (Scorvo Filho et al. 1992; Scorvo Filho et al. 1995). However, although *M.*
 2292 *liza* individuals larger than 3 cm can tolerate salinities from seawater to freshwater
 2293 (Fonseca and Spach 1998/1999), juvenile *M. liza* growth is hampered/damage in
 2294 freshwater (Lisboa, chapter 2).

2295 The whole functional and metabolic system operation of an organism in any
 2296 environment rely on homeostase and metabolism maintenance. In order to maintain its
 2297 homeostase and metabolism in low salinities, teleosteos need to face, among other
 2298 challenges, ion loss and excessive water gain. In order to compensate ion loss, fish
 2299 actively uptake ions from its surrounding medium and/or from diet (Karnaky 1998;
 2300 Baldisserotto et al 2007; Wood 2001; Marshall and Grosell 2006).

2301 The uptake of sodium uptake from the water occurs through the chloride cell
 2302 apical membrane, by the sodium channel. The sodium entrance through the apical
 2303 membrane is possible due to an electrical gradient that favors sodium entry, which in
 2304 turn is generated by the basal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and apical $\text{V-H}^+ - \text{ATPase}$. Moreover, at
 2305 the same time that $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ generates the electrical gradient for cellular apical
 2306 sodium uptake, this enzyme also is responsible for sodium transport from the cells to the
 2307 plasma. As well, the chloride uptake from the water to the plasma occurs through the
 2308 chloride cell apical membrane, however via apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and then by
 2309 basal chloride channel. However, this ion uptake is an energy demanding process
 2310 (Boeuf & Payan 2001; Marshall and Grosell 2006; Baldisserotto et al 2007).

To operate the ion transport, the Na^+ - K^+ -ATPase and V- H^+ -ATPase require energy, the energy that could be used for growth (Baldissierotto et al 2007; Wood 2001; Karnaky 1998). However, since fish have mechanisms that enable ion uptake from the digestory tract, dietary salt supplementation could decrease metabolic cost with the active ion uptake from the environment and thus sparing energy for growth (Gatlin et al 1992; Nandeeshha et al. 2000; Eroldogan et al. 2005; Appelbaum and Arockiaraj 2009; Cnaani et al. 2010). Moreover, sodium plays a fundamental role in the absorption of nutrients, since the sodium presence is one of requirements to amino acids, glucose and fatty acids absorption (Klein et al 1998; Harpaz et al 2005; Baldissierotto 2009).

The purpose of this study was to investigate the dietary salt supplementation on the overall performance of juvenile *M. liza* reared in freshwater.

2. Materials and methods

2.1. Experimental fish

Juvenile ($1.8 \pm 0.8\text{g}$) *Mugil liza* were captured at Cassino Beach (Southern Brazil) with a beach seine net and taken to the Laboratory of Marine Fish Culture at the Federal University of Rio Grande (FURG). Acclimation to laboratory conditions was made in a single 1,000L tank for 20 days. During this period fish were fed 3x/day until apparent satiation with a commercial diet (Aqua Line Supra Tilapia Gaiola - 32% protein, 7% lipid, 3,500Kcal/Kg).

2332 2.2. *Experimental set-up*

2333 The experimental system consisted of 16 tanks (50L) placed in a RAS composed
2334 of a biofilter, a mechanical filter, an UV sterilizer, and a temperature controller. The
2335 water flow rate in the tanks was 400mL/min. Photoperiod was controlled by a timer
2336 (14L:10D) and the water quality control was similar to acclimation period. Acclimation
2337 to low salinity was made during one week by reducing the salinity to 50% per day with
2338 de-chlorinated tap water. Fifteen fish (4.5 ± 0.7 g) were than randomly stocked into each
2339 of the 16 experimental tanks. There were no significant differences among the mean
2340 weight of fish among experimental tanks at the onset of the experiment ($p > 0.05$).
2341 Growth measurements (total weight and length) were taken at 15-day intervals on all
2342 fish anesthetized (50ppm benzocain).

2343 Fish were hand fed until apparent satiation 3x/day (0900, 1300 and 1700 h). In
2344 order to minimize salt leaching, food was offered in small portions, ensuring fish would
2345 consume it in 4s. Total apparent food consumption (TAFC) was estimated by the sum of
2346 all feed offered for each tank during the experiment.

2347

2348 2.3. *Water quality*

2349 Water temperature, dissolved oxygen content and saturation (oxymeter YSI M),
2350 salinity (refractometer, Atago), pH (pH meter, Quimis), and total ammonia (APHA

2005) were measured daily and averaged respectively, $27.09 \pm 0.04^{\circ}\text{C}$, 7.02 ± 0.04 mg $\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, $89.0 \pm 0.5\%$, 0% , 7.91 ± 0.02 ; and 0.01 ± 0.01 (N-NH₃).

2353

2354 2.4. Diet preparation

Four levels of salt supplementation (SS) were tested on the same diet used during the acclimation period. The basal diet was ground, and NaCl previously dissolved in water was added. The mixture was forced through a meat grinder with 2 mm-diameter opening. The non-supplemented diet went through the same procedure, but no salt was added. Afterwards, pellets were dried in an oven at 60°C and stored in plastic bags at -20°C until use. The actual Na⁺ concentrations after supplementation of the diet with salt correspond to 0.9%, 5.4%, 8.0%, and 13.2%.

2362

2363 2.5. Survival, growth and feed parameters

At the end of experiment, the following parameters were measured:

Survival (S) = $\left(\frac{Ni - Nf}{Ni} \right) \times 100$; Ni is the initial and Nf is the final number of fish.

Daily specific growth rate (G) = $\left(\frac{Lnfw - Lniw}{day} \right) \times 100$; fw and iw are final and initial mean weight.

Weight gain (WG) = $100 \times (fw/iw)$.

2369 Fulton's Condition Factor (K) = $\left(\frac{BW(g)}{L^3(cm)}\right)$; BW is the body weight (g) and L is the
 2370 length (cm).

2371 Feed Conversion Efficiency (FCE) = $\left(\frac{BG(g)}{FC(g)}\right)$; BG is biomass gain and FC is dry feed
 2372 consumed (g).

2373 Weight coefficient of variation (WCV) = $\left(\frac{SD}{MW(g)}\right) \times 100$; SD is standard deviation and
 2374 MW is the mean weight.

2375

2376 *2.6. Tissues collection and analysis*

2377 At the end of experimental period, fish were anesthetized (50 ppm benzocain)
 2378 and blood samples were collected from the caudal vein with 1-mL heparinized syringes.
 2379 Plasma was separated by a refrigerated centrifuge (3500 rpm, at 4°C for 15min) and
 2380 stored at -80°C. Also gill and liver samples were collected for subsequent determination
 2381 of Na⁺- K⁺- ATPase activity and liver glycogen content.

2382 For Na⁺ content determination, diet samples were weighed, dried, and
 2383 completely digested in opened eppendorf tube containing 500µl of HNO₃ (Suprapur®,
 2384 MERCK, HAAR, GERMANY) during 3 days. Digested samples were centrifuged (10
 2385 min; 4°C; 10,000 g; Mikro22R, HETTICH, GERMANY) and the supernatant was

2386 collected for sodium measurements by an atomic absorption spectrophotometer (GBC
2387 AAS 932 PLUS).

2388 Gill samples were homogenized with 300 µl SEID buffer (pH 7.3) and centrifuged
2389 at 10,000 g for 30 min (4°C). The supernatant was used for gill NKA activity
2390 determination following procedures described by McCormick (1993).

2391 Liver glycogen content was determined using an adaptation of the method of Carr
2392 and Neff (1984). Glucose concentration was analyzed using a commercial reagent kit
2393 based on the glucose-oxidase method (Doles, Goiânia, GO, Brazil).

2394

2395 *2.7. Statistical analysis*

2396 The results were analyzed by One-Way analysis of variance (ANOVA) followed
2397 by the Test of Tukey. All analyses were performed with significance level of $P < 0.05$.
2398 Weight gain and SS data were analyzed by non-linear regression analysis (quadratic).
2399 The SS that result in maximum WG was calculated by $-b/2a$ (Shearer 2000)

3. Results

Survival of juvenile lebranche mullet was not affected ($p>0.05$) and eventual mortalities were due to fish jumping out of the tank.

The dietary salt supplementation affected growth of juvenile lebranche mullet. The final weight was higher for fish fed the two lowest salt supplemented diets, while fish fed the diet containing 13.2% SS achieved the lowest final weight ($p<0.05$). The reduced weight gain was already noticeable 15 days after the start of the experiment (Figure 1). The SGR followed the same trend, where the growth rate of fish fed the largest amount of salt was significantly reduced ($p<0.05$). However, there was no influence of the dietary salt content on the coefficient of variation of the final weight ($p>0.05$).

Food consumption was similar for fish fed diets containing up to 8.0% SS ($p>0.05$), but it decreased sharply for those fed the diet supplemented with 13.2% salt ($p<0.05$). The Fulton's Condition Factor (K) was also lower for fish fed the highest salt supplementation level ($p<0.05$) (Table 1).

Among the physiological parameters, the dietary salt supplementation affected gill Na^+ - K^+ - ATPase activity ($p<0.05$) (Figure 2), but not the liver glycogen content (Figure 3), that were similar among treatments ($p>0.05$). The gill Na^+ - K^+ - ATPase activity differed between fish fed diets 5.4 and 13.2% SS, with the highest activity at the higher dietary Na^+ level.

2421 The ideal salt supplementation level was estimated by quadratic linear regression
2422 between experimental salt supplementation levels and WG and it corresponds to 2.6%
2423 Na⁺

2424 **3. Discussion**

2425

2426 Juvenile *M. liza* showed a strong osmoregulatory capacity, confirming that it can
2427 be reared in freshwater (chapter 1). It was further observed that growth of juvenile
2428 lebranche mullet was hampered when they were reared in freshwater and hiposmotic
2429 environments (chapter 2), thus the present study was conducted to evaluate whether
2430 dietary salt supplementation could mitigate the negative effect of limited environmental
2431 salt availability.

2432 Salinity can influence fish growth by several ways as it interferes on hormonal
2433 pathways, on digestive performance, food intake, and/or metabolic state (Boeuf and
2434 Payan 2001). In a metabolic point of view, growth damage in low salinity could occur
2435 due to the energy expenditure with active uptake of ions from the surrounding medium
2436 and/or from diet, in order to reestablish homeostasis (Gatlin III et al. 1992; Karnaky
2437 1998; Wood 2001; Baldisserotto et al 2007). Thus, it has been proven for some species
2438 reared in freshwater, that dietary salt supplementation enhances fish growth due to
2439 decreased osmoregulatory cost, as the energy spared could be used to increase growth
2440 (Eroldogan et al. 2005; Appelbaum and Arockiaraj 2009; Cnaani et al. 2010).

2441 Within the range of dietary Na^+ tested in this study, juvenile lebranche mullet
2442 responded positively up to the 5.4% SS. Feed efficiency was similar, but food
2443 consumption was lower at the highest level of salt inclusion in the diet, thus suggesting
2444 there was a palatability problem with the increased salt content.

2445 Smith et al. (1995) discussed about the consequences of excessive salt for fish,
2446 which is characterized by the increased gill Na^+ efflux. The gill Na^+ - K^+ - ATPase
2447 activity was higher specifically at the highest SS level, corroborating with the supposed
2448 osmoregulatory work performance in order to secrete the salt excess arising in excess
2449 from the diet. Therefore, lower growth at high SS level can be attributed to the salt
2450 excess effect on food consumption and also on the osmoregulatory energy demand.

2451 The presumed energy demand as consequence of higher gill Na^+ - K^+ -ATPase
2452 activity supposedly should be supplied by liver glycogen mobilization, however there is
2453 no SS effect on liver glycogen storage. Based on reports of Woo and Kelly (1995) and
2454 Tseng et al. (2008), at this osmotic condition, the *M. liza* metabolism probably is based
2455 on other substrates as energy source. Furthermore, the possibility that indeed, at this
2456 developmental stage, metabolism maybe resorts to other energy-rich substrate to match,
2457 when necessary, the extra energy demand should be evaluated.

2458 The quadratic regression pointed to 2.6% as the best salt supplementation level for
2459 growth of juvenile *M. liza*. This level is equivalent to that observed for other fish
2460 species (Table 2) that, in general, show moderate levels of dietary salt requirement (1-
2461 3%) in order to cope with low salinity, or even in fresh water, as it was the case of the

2462 present study (Gatlin III et al. 1992; Shiau and Li-Shan 2004; Eroldogan et al. 2005;
2463 Cnaani et al. 2010). Finally, juvenile mullet fed a diet containing up to 5.4% SS show
2464 positive zootechnical and physiological responses compared to mullet fed diets with
2465 higher salt content. However, the best dietary Na⁺ level was estimated at 2.6%.

2466 **4. Reference**

2467

2468 Appelbaum S, Arockiaraj AJ (2009) Salt incorporated diets for enhancing growth
2469 performance and survival in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. juveniles reared
2470 in low saline brackish water. Sci. Mar. (Barc.) 73(S1):213-217

2471 Carr RS, Neff JM (1984) Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue
2472 glycogen. Comparative Biochemistry and Physiology B **77**:447-449

2473 Cardona L (2000) Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of
2474 Mediterranean flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae).
2475 Estuarine and Coastal Shelf Science 50:727-737

2476 Cnaani A, Barki A, Slosman T, Scharcanski A, Milstein A, Harpaz S (2010) Dietary salt
2477 supplement increases the growth rate in freshwater cultured tilapia hybrids.
2478 Aquaculture Research 41:1545-1548

2479 Baldisserotto B, Mancera Romero JM, Kapoor BG (Eds) (2007) *Fish Osmoregulation*,
2480 Ed. Science Publishers, Santa Maria, 527p.

2481 Boeuf G, Payan P (2001) How should salinity influence fish growth? Comparative
2482 Biochemistry and Physiology C 130:411–423

- 2483 Carvalho CVA, Bianchini A, Tesser M, Sampaio LA (2010) The effect of protein levels
2484 on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil*
2485 *planatus* (Gunther). Aquaculture Research 41:511-518
- 2486 Eroldogan OT, Kumlu M, Kir M, Kiris GA (2005) Enhancement of growth and feed
2487 utilization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed supplementary
2488 dietary salt in freshwater. Aquaculture Research 36:361-369
- 2489 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2010. The State of
2490 World Fisheries and Aquaculture 2010. Rome, FAO – Fisheries and Aquaculture
2491 department. 197p. Available on internet at:
2492 <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>. Accessed in 24/10/2012.
- 2493 Fonseca Neto, Spach H (1998/1999) Survival of juveniles of *Mugil platanus* Günther,
2494 1880 (Pisces, Mugilidae) in different salinities. Boletim do Instituto de Pesca
2495 25:13-17
- 2496 Fontaínhas-Fernandes A, Gomes E, Reis-Henriques MA, Coimbra J (2002) Effect of
2497 supplemental dietary sodium chloride on growth rate of tilapia *Oreochromis*
2498 *niloticus* reared in variable salinities. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária
2499 e Zootecnia 54:04-21
- 2500 Gatlin DM, MacKenzie DS, Craig SR, Neill WH (1992) Effect of dietary sodium
2501 chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. Progressive Fishery
2502 Culture 54:220-227

- 2503 Harpaz S, Hakim Y, Slosman T, Eroldogan OT (2005) Effects of adding salt to the diet
2504 of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks,
2505 on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture* 248:315-324
- 2506 Karnaky KJ Jr (1998) Osmotic and ionic regulation. In: Evans DH, editor. *The*
2507 *Physiology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press vol., pp 157-176 Khéríji SM, Cafsi
2508 M El, Masmoudi W, Castell JD, Romdhane MS (2003) Salinity and temperature
2509 effects on the lipid composition of mullet sea fry (*Mugil cephalus*, Linne, 1758).
2510 *Aquaculture International* 11:571-582
- 2511 McCormick SD (1993) Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-
2512 ATPase activity. *Canadian Journal of Aquatic Sciences* 50:656-658
- 2513 Marshall WS, Grosell M (2006) Ion transport, osmoregulation and acid-base balance.
2514 In: Evans DH, Claiborne JB (eds) *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca
2515 Raton, FL, pp 177-230
- 2516 Menezes NA, Figueiredo JL (1980) *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil*.
2517 São Paulo, USP. pp 96
- 2518 Miranda-Filho KC, Wasielesky W, Maçada AP (1995) Efeito da amônia e nitrito no
2519 crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *Revista Brasileira de*
2520 *Biologia* 55:45-50

- 2521 Miranda Filho K, Tesser MB, Sampaio LA, Godinho HM (2012) Tainha. In:
2522 Baldisserotto B, Gomes LC (eds) Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil.
2523 UFSM Press, Santa Maria pp. 541-558
- 2524 Okamoto MH, Sampaio LA, Maçada AP (2006) Efeito da temperatura sobre o
2525 crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880.
2526 *Atlântica* 28:61-66
- 2527 Nandeeshha MC, Gangadhara B, Keshavanath P, Varghese TJ (2000) Effect of dietary
2528 sodium chloride supplementation on growth, biochemical composition and
2529 digestive enzyme activity of young *Cyprinus carpio* (Linn.) and *Cirrhinus*
2530 *mrigala* (Ham.). *Journal of Aquatic Tropical* 15:135-144
- 2531 Oliveira IR, Soares LSH (1996) Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880
2532 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil.
2533 *Boletim do Instituto de Pesca* 23:95–104
- 2534 O'Neill, Bernadette, Raedemarker F De, McGrath D, Brophy D (2011) An
2535 experimental investigation of salinity effects on growth, development and
2536 condition in the European flounder (*Platichthys flesus*. L.). *Journal of*
2537 *Experimental Marine Biology and Ecology* 410:39-44
- 2538 Halpin PM (2000) Habitat use by intertidal salt-marsh fish: trade-offs between predation
2539 and growth. *Marine and Ecology Progress Series* 198:203-214

- 2540 Poersh LH, Santos MHS, Miranda-Filho KC, Wasielesky W (2007) Efeito agudo do
2541 nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces:Mugilidae). Boletim do
2542 Instituto de Pesca 33 (2):247-252
- 2543 Reis EG, D’Incao F (2000) The present status of artisanal fisheries of extreme Southern
2544 Brazil: an effort towards community-based management. Ocean & Coastal
2545 Management 43:585-595
- 2546 Salman NA, Eddy FB (1988) Effect of dietary sodium chloride on growth food intake
2547 and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson).
2548 Aquaculture 70:131-144
- 2549 Sampaio LA, Bianchini B (2002) Salinity effects on osmoregulation and growth of the
2550 euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. Journal of Experimental Marine
2551 Biology and Ecology 269:187-196
- 2552 Sampaio LA, Wasielesky W, Miranda Filho KC (2002) Effect of salinity on acute
2553 toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bulletin of
2554 Environmental Contamination and Toxicology 68:668-674
- 2555 Scorvo Filho JD, Dias Era, Ayroza LMS, Novato PFC (1992) Efeito da densidade sobre
2556 o desenvolvimento de alevinos da tainha listrada (*Mugil platanus*) em água doce.
2557 Boletim do Instituto de Pesca 19:105-109
- 2558 Scorvo Filho JD, Ayroza LMS, Novato PFC, Dia Era (1995) Efeito da densidade de
2559 estocagem sobre o crescimento da tainha listrada (*Mugil platanus*) criada em

- 2560 mono e policultivo com carpa comum (*Cyprinus carpio*) na região do Vale do
2561 Ribeira, SP. Boletim do Instituto de Pesca 22(2):85-93
- 2562 Shearer KD (2000) Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary
2563 nutrient requirement studies for fish: a critical review. Aquaculture Nutrition
2564 6:91-102
- 2565 Shi-Yen, Li-Shan (2004) Dietary sodium requirement determined for juvenile hybrid
2566 tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in fresh water and seawater.
2567 British Journal of Nutrition 91:585-590
- 2568 Smith NF, Eddy FB, Talbot C (1995) Effect of dietary salt load on transepithelial Na⁺
2569 exchange in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Journal of
2570 Experimental Biology 198:2359-2364
2571 Tseng Yung-Che, Hwang, Pung-Pung
(2008) Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish.
2572 Comparative Biochemistry and Physiology C 148:419-429
- 2573 Tsuzuki MY, Sugai JK, Maciel, Francisco CJ, Cerqueira VR (2001) Survival, growth
2574 and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus*
2575 *parallelus*) reared at different salinities. Aquaculture 261:319-325
- 2576 Vieira JP (1985) Distribuição, abundância e alimentação dos jovens de Mugilidae no
2577 estuário da Lagoa dos Patos e movimentos reprodutivos da “Tainha” (*Mugil*
2578 *platanus* Gunther, 1880) no litoral sul do Brasil. Dissertação de Mestrado em

- 2579 Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil,
2580 104 p
- 2581 Vieira JP, Scalabrin C (1991) Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus*)
2582 Günther 1880, no sul do Brasil. Atlântica 13:131-141
- 2583 Wood CM (2001) Toxic responses of the gill. In: Schlenk D, Benson W.H (eds.) Target
2584 Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Vol. 1, Organs, London, pp 1-
2585 89
- 2586 Woo NYS, Kelly SP (1995) Effects of salinity and nutritional status on growth and
2587 metabolism of *Sparus sarba* in closed seawater system. Aquaculture 135:229-238.

2588 **Table 1.** Weight gain (WG), weight coefficient of variation (CV), specific growth rate
 2589 (SGR), feed efficiency (FE), food consumption (FC) and Fulton coefficient (K) ($\pm$ SE)
 2590 in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* fed on diets supplemented with different levels
 2591 of NaCl and reared in freshwater for 45 days¹.

Parameter	Salt Supplementation (%)			
	0.9	5.4	8.0	13.2
WG (%)	280,27 $\pm$ 10,83 ^a	286,42 $\pm$ 9,97 ^a	273,18 $\pm$ 8,02 ^a	209,21 $\pm$ 11,50 ^b
CV weigh	0.13 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01
SGR	2.57 $\pm$ 0.10 ^a	2.63 $\pm$ 0.09 ^{ab}	2.51 $\pm$ 0.07 ^{ab}	1.83 $\pm$ 0.13 ^b
FE	0.37 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02
FC (g)	332.95 $\pm$ 9.32 ^a	325.50 $\pm$ 16.26 ^a	314.48 $\pm$ 2.37 ^a	226.65 $\pm$ 8.18 ^b
K	2.90 $\pm$ 0.03 ^a	3.06 $\pm$ 0.02 ^a	2.81 $\pm$ 0.02 ^a	2.34 $\pm$ 0.01 ^b

2592 ¹ Data are expressed as mean $\pm$ standard error (n = 6). Different letters indicates significant
 2593 difference ($P < 0.05$).

2594 **Table 2.** Ideal salt supplementation (SS) level determined for some teleosts reared in
 2595 freshwater.

Specie	Classification	Ideal SS level (%Na ⁺ /Kg)	Reference
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Euryhaline	2	Gatlin et al. 1992
Hybrid tilapia	Euryhaline	0.2	Shi-Yen & Li-Shan 2004
<i>Labeo rohita</i>	Freshwater	1	Gangadhara et al. 2004
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Euryhaline	3	Eroldogan et al. 2005
<i>Lates calcarifer</i>	Euryhaline	Up to 4 (2)	Harpaz et al. 2005
<i>Carpa</i>	Freshwater	3	Cnnani et al. 2010
Mugil liza	Euryhaline	3.4	Present study

2596

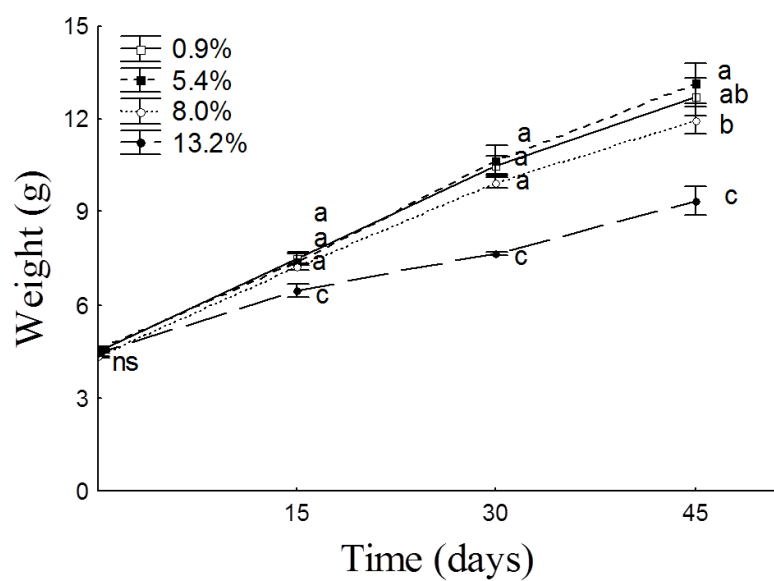
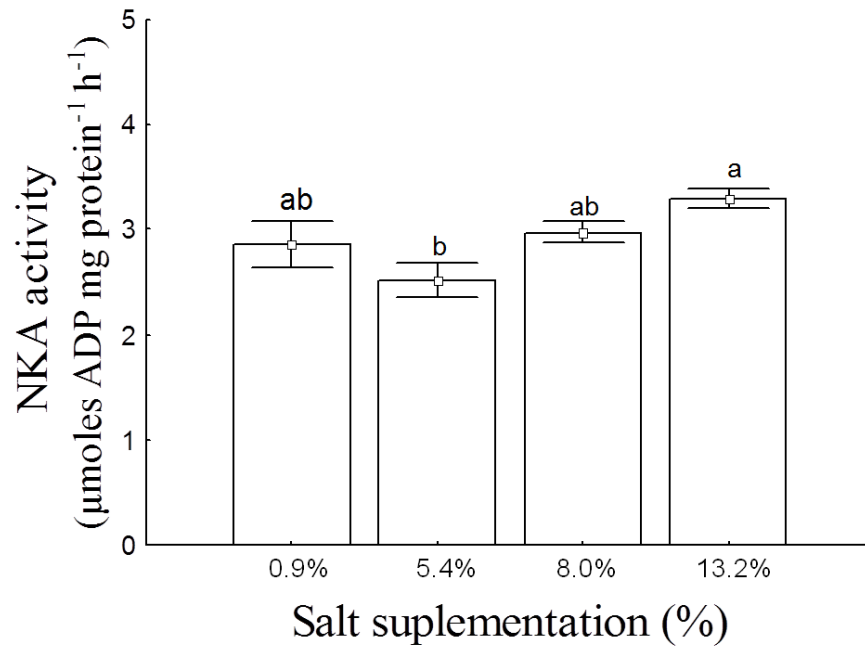


Figure 1. Weight of juvenile lebranche mullet *Mugil liza* fed on diets supplemented with different levels of NaCl and reared in freshwater for 45 days¹.

¹Data are expressed as mean $\pm$ standard error (n = 15). Different letters indicates significant difference ($P < 0.05$)



2606

2607

2608 **Figure 2.** Gill Na⁺- K⁺- ATPase (NKA) activity in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* fed
 2609 on diets supplemented with different levels of NaCl and reared in freshwater during 45
 2610 days¹.

2611

2612 ¹Data are expressed as mean ± standard error (n = 4). Different letters indicates significant
 2613 difference ($P < 0.05$).

2614

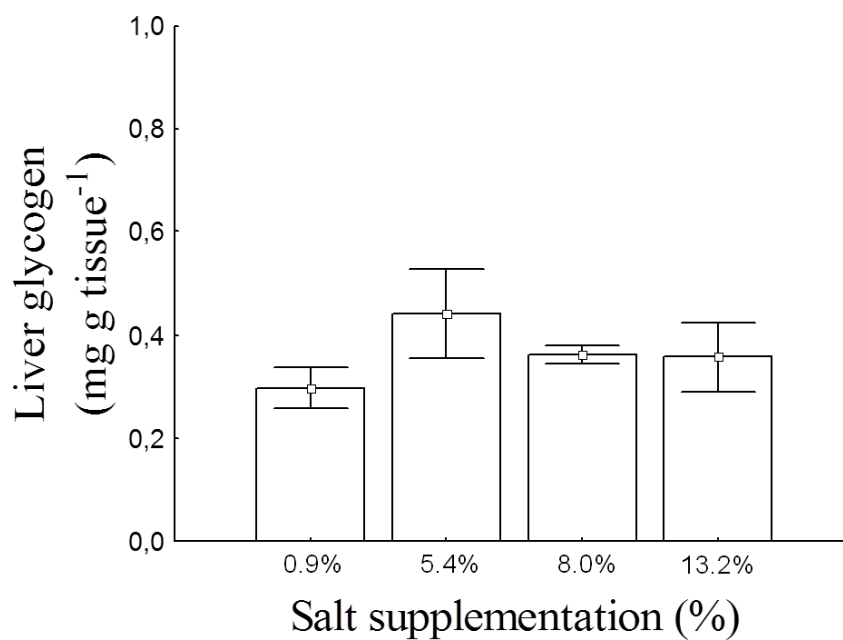


Figure 3. Liver glycogen in juvenile lebranche mullet *Mugil liza* fed on diets supplemented with different levels of NaCl and reared in freshwater during 45 days¹.

¹Data are expressed as mean $\pm$ standard error (n = 4).