

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DA COMPOSIÇÃO IÔNICA DA ÁGUA NO DESENVOLVIMENTO
DE LARVAS DE *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) NO ESTÁGIO II.

MARGARETE MALLASEN
ZOOTECNISTA

JABOTICABAL - SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DA COMPOSIÇÃO IÔNICA DA ÁGUA NO DESENVOLVIMENTO
DE LARVAS DE *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) NO ESTÁGIO II.

MARGARETE MALLASEN

Orientador: Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti

Dissertação apresentada ao Centro
de Aquicultura da UNESP, para
obtenção do Título de Mestre em
Aquicultura - Área de Concentração
em Aquicultura.

JABOTICABAL - SP
Outubro - 1997

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARGARETE MALLASEN, nascida em 9 de fevereiro de 1972, em Santo André - SP, é Zootecnista formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal - UNESP, em agosto de 1994.

DEDICO

Aos meus pais

Tomas e Cecília

por tudo que sou

À minha irmã, meu cunhado e minha sobrinha

Marta, Luiz e Ana Carolina

por todo apoio e carinho

OFEREÇO

Ao meu namorado

Rodrigo

por todo amor e companheirismo

AGRADEÇO,

ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti pela orientação, dedicação e amizade concedidos nestes anos;

à Prof. Dra. Anneliese Margarete Wernick e ao Dr. Hécio Luis de Almeida Marques pelas críticas e sugestões apresentadas;

ao CAUNESP pelos anos que aqui me acolheu;

ao CNPq pela bolsa de estudo concedida;

à Elisandra , Juliana e Cristina pela ajuda em informática;

aos funcionários do Laboratório de Carcinicultura: José Roberto Polachini e Valdecir F. de Lima, que colaboraram na execução do trabalho;

aos colegas do curso, Sérgio, Colete, Paulo, Cecília, Roberto, Eduardo, Berenice, Sato,...pelo convívio;

à Dra. Deborah Ismael pelas sugestões para confecção deste trabalho;

aos funcionários da Pós-Graduação e secretárias do CAUNESP: Fieno, Vera, Fátima e Mônica que sempre estavam prontos para me auxiliar;

à todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus que me deu forças para suportar todos os momentos difíceis e conseguir chegar até aqui.

Muito Obrigada.

ÍNDICE

	página
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Preparação da água do mar artificial	13
3.2 Fases do experimento	14
3.3 Obtenção das larvas e montagem do experimento	20
3.4 Coleta de dados	22
3.5 Delineamento experimental e análise dos dados	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ABSTRACT	54

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1. Composição iônica da água do mar.	6
2. Macroelementos, microelementos e elementos traços utilizados na preparação da água do mar artificial.	15
3. Tratamentos da Fase 1.	16
4. Tratamentos da Fase 2.	16
5. Tratamentos da Fase 3.	18
6. Tratamentos da Fase 4.	18
7. Tratamentos da Fase 5.	19
8. Concentração na fórmula da água do mar artificial, concentração como impureza e respectivo percentual máximo de ocorrência dos íons contaminadores de outros sais.	20
9. Horas médias de sobrevivência das larvas nos tratamentos da Fase 1.	25
10. Horas médias de sobrevivência das larvas nos tratamentos da Fase 2.	26
11. Horas médias de sobrevivência das larvas nos tratamentos da Fase 3.	29
12. Horas médias de sobrevivência das larvas nos tratamentos da Fase 4.	31
13. Horas médias de sobrevivência das larvas nos tratamentos da Fase 5.	33
14. Temperatura da água e temperaturas máxima e mínima da sala de cultivo em cada fase do experimento.	35
15. Salinidade média dos tratamentos em cada fase do experimento.	36
16. Valores iniciais e médias finais de pH dos tratamentos em cada fase do experimento.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1. Curvas de sobrevivência obtidas para os seis tratamentos da Fase 1.	27
2. Curvas de sobrevivência obtidas para os sete tratamentos da Fase 2.	28
3. Curvas de sobrevivência obtidas para os nove tratamentos da Fase 3.	30
4. Curvas de sobrevivência obtidas para os nove tratamentos da Fase 4.	32
5. Curvas de sobrevivência obtidas para os cinco tratamentos da Fase 5.	34

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a importância da presença na água dos íons Ca^{2+} , K^{+} , HCO_3^{-} , Br^{-} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^{+} , MoO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, Al^{3+} , Rb^{+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} para o desenvolvimento do *Macrobrachium rosenbergii* no estágio larval II, visando fornecer subsídios para a otimização da composição iônica da água salobra utilizada na larvicultura dessa espécie. A água do mar artificial foi preparada conforme a formulação usada no setor de Carcinicultura do CAUNESP, cujos sais são classificados em macroelementos (MA), microelementos (MI) e elementos traços (ET). Foram realizadas cinco etapas seqüencialmente. Na primeira avaliaram-se águas salobras preparadas com MA + MI + ET, sendo que, em cada tratamento, foi eliminado um dos seguintes elementos traços: alumínio, rubídeo, zinco, cobalto e cobre. Na segunda a água foi preparada com MA + MI e, em cada tratamento adicionou-se um dos elementos traços. Na Fase 3 foram analisadas formulações preparadas com MA + MI, sendo que, em cada tratamento foi eliminado um dos seguintes microelementos: bromo, estrôncio, manganês, fosfato, lítio, molibdato e tiosulfato. Na Fase 4 a água foi preparada com MA e, em cada tratamento, adicionou-se um dos microelementos. Na última fase foram avaliados cinco meios preparados com MA + Br⁻; em cada tratamento foi eliminado um dos seguintes íons: cálcio, potássio, bicarbonato e brometo. Todas as etapas foram realizadas seguindo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições (três béqueres) para cada

tratamento. Aplicou-se um teste de inanição, que consistiu na estocagem de seis larvas de *M. rosenbergii*, no estágio larval II, em béqueres de 30 ml, contendo 15 ml de água salobra a 12‰, mantidos em temperatura ambiente em torno de 30°C. A cada oito horas contou-se o número de larvas vivas em cada unidade experimental, para o cálculo do tempo médio de vida em todos os tratamentos. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey. A presença dos elementos traços Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} e dos microelementos: Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ não favoreceram o aumento do tempo de vida das larvas no segundo estágio larval. Estes íons são, aparentemente dispensáveis, mas podem tornar-se essenciais em outros estágios de desenvolvimento larval ou ter um efeito retardado. O tiosulfato de sódio deve ser adicionado às formulações de água do mar artificial, quando se utilizar água clorada para diluição dos sais. Os íons K^+ , Ca^{2+} , Br^- e HCO_3^- são essenciais para o desenvolvimento larval. A água é um importante fonte desses elementos para as larvas, pelo menos até o estágio II, e estas devem ter mecanismos eficientes de absorção desses elementos.

1. INTRODUÇÃO

Diversas espécies de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* vem sendo estudadas e cultivadas em países de climas tropical e subtropical. Dentre elas, *Macrobrachium rosenbergii* é a mais utilizada em projetos de aquicultura (SEBASTIAN, 1990; VALENTI, 1993a; NEW, 1995), principalmente porque a tecnologia para sua criação está mais desenvolvida (VALENTI, 1990).

Os jovens e adultos de *M. rosenbergii* normalmente habitam corpos de água doce, porém o desenvolvimento larval desta espécie ocorre em água salobra até a metamorfose em pós-larva; sendo assim, a maioria das larviculturas comerciais localizam-se junto ao litoral. No entanto, sabe-se que no Brasil existe um grande potencial para a produção de *M. rosenbergii* no interior e pós-larvas são transportadas de avião por milhares de quilômetros a um custo elevado (VALENTI, 1993a).

WEBSTER & TIDWELL (1995) verificaram que o crescimento comercial e residencial na costa dos Estados Unidos impossibilita o desenvolvimento da aquicultura nessa região devido a valorização do preço da terra. Os mesmos autores afirmam que áreas do interior do país podem favorecer o aumento comercial

de camarões.

A utilização de água do mar artificial em sistema de recirculação pode estimular a implantação de larviculturas em regiões distantes do litoral e próximas das fazendas de engorda e dos mercados consumidores. Além disso, a água do mar sintética tem a vantagem de evitar a introdução nos tanques de desenvolvimento larval de substâncias tóxicas, provenientes da poluição do mar, parasitas, predadores e competidores dos camarões. Outro proveito do uso da água do mar artificial, segundo NEIHEISEL & YOUNG (1992), é a possibilidade de reproduzir uma água uniforme em termos de qualidade, pois a água do mar natural pode perder suas propriedades quando armazenada por longo período.

Há mais de um século a água do mar artificial é empregada na manutenção de animais marinhos. A primeira tentativa ocorreu em 1869 nos aquários públicos de Berlim, tendo sido utilizada, com sucesso, uma mistura com quatro tipos de sais (Hoffmam, 1884 in SPOTTE et al., 1984). A partir daí, várias receitas de água do mar vem sendo testadas e, baseadas nestes estudos, empresas privadas desenvolveram suas fórmulas. No entanto, estas, geralmente, não apresentam a composição química exata que foi utilizada (SPOTTE et al., 1984). Embora tenha havido uma evolução na tecnologia de preparação de água do mar comercial, este problema ainda não foi totalmente resolvido. O desenvolvimento de composições específicas para espécies cultivadas em escala comercial, certamente traria benefícios técnicos e econômicos.

BIDWELL & SPOTTE (1985) observaram que, em geral, quanto mais simples o organismo mais complexa é a formulação da água do mar artificial exigida para seu desenvolvimento. Para as algas, por exemplo, todos os nutrientes necessários devem estar dissolvidos no ambiente. Em contraste, os peixes sobrevivem satisfatoriamente em água artificial composta apenas por macroatmentos, sendo que os outros elementos são obtidos a partir do alimento. Assim sendo, para atender às exigências fisiológicas de diferentes organismos marinhos foram estudadas várias formulações. Em sua revisão, BIDWELL & SPOTTE (1985) listam mais de 90 fórmulas.

LING (1969) foi o primeiro pesquisador a relatar a utilização de água do mar artificial no cultivo de larvas de *M. rosenbergii*, porém, somente na década de setenta foram obtidos resultados promissores (SMITH et al., 1976). Recentemente, alguns trabalhos apresentaram resultados favoráveis em termos de produtividade, dentre os quais citamos NAIR & HAMEED (1992), VALENTI (1993b) e SILVA (1995). Tentativas de produzir comercialmente pós-larvas de *M. rosenbergii* em água do mar sintética foram iniciadas na Índia (SEBASTIAN, 1990) e no Brasil (VALENTI, 1993a). No entanto, mais estudos são necessários para formular uma água do mar artificial bem definida, possibilitando sua reprodução e aplicação prática.

FUNGE - SMITH et al. (1995) propõem que o custo da água do mar artificial para a larvicultura de *M. rosenbergii* seja reduzido, omitindo da fórmula alguns elementos traços que não prejudiquem a sobrevivência das larvas.

SILVA (1995) observou que o desenvolvimento larval de *M.*

rosenbergii pode ocorrer em um meio contendo apenas 7 íons (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- e Br^-). No entanto, MALLASEN & VALENTI (submetido a publicação) demonstraram que a sobrevivência é significativamente inferior em um meio contendo 13 íons (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , Br^- , Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) do que em água do mar natural. Isto indica que a presença de alguns íons no meio pode não ser essencial para os animais completarem a metamorfose mas pode auxiliar nos processos fisiológicos da espécie. Mais estudos devem ser realizados para obtenção de uma fórmula adequada para a larvicultura de *M. rosenbergii*.

STERN et al. (1987) evidenciou que juvenis de *M. rosenbergii* têm a habilidade de regular e manter constantes as concentrações de certos íons chaves (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) na hemolinfa. FUNGE - SMITH et al. (1995) estudando adultos dessa mesma espécie, observaram mecanismos de regulação do brometo e estrôncio, sugerindo que esses íons podem ser importantes na fisiologia do *M. rosenbergii*. Embora estes autores façam referência a ação do Br^- e Sr^{2+} nas larvas desta mesma espécie, nenhum trabalho enfocando o efeito da composição iônica sobre as larvas foi encontrado na literatura.

Neste trabalho, avaliou-se a importância da presença na água dos íons Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , Br^- , Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} para o desenvolvimento do *M. rosenbergii* no estágio larval II, visando fornecer subsídios para a otimização da composição iônica da água salobra usada para a larvicultura dessa espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A água do mar é uma solução aquosa contendo gases e material natural orgânico e inorgânico em suspensão (KINNE, 1964; MANAHAN, 1990).

Do ponto de vista fisiológico, a água do mar é a solução melhor balanceada em sais minerais (GALTSOFF, 1937). Os organismos que vivem neste meio são afetados pela sua composição iônica, pois muitos dos elementos em solução são necessários para os processos bioquímicos vitais (SPOTTE, 1979). Para Arnon & Stout (1939 in SPOTTE, 1979) um determinado íon é essencial quando este interfere diretamente nas funções metabólicas do organismo, no seu crescimento ou ciclo de vida .

Os íons mais abundantes na água do mar, de acordo com BIDWELL & SPOTTE (1985), estão listados em ordem decrescente de concentração na Tabela 1. Segundo FOYN (1975) e OPEN UNIVERSITY COURSE TEAM (1989), os íons que perfazem 99,9% dos elementos dissolvidos na água do mar são o cloro, sulfato, bicarbonato, bromo, flúor, ácido bórico, sódio, magnésio, cálcio, potássio e estrôncio. Estes são, geralmente denominados de macroelementos.

Tabela 1. Composição iônica da água do mar.

Íon	mol/L	Íon	mol/L
Cl ⁻	5,36 . 10 ⁻¹	Rb ⁺	1,40 . 10 ⁻⁶
Na ⁺	4,57 . 10 ⁻¹	I ⁻	4,73 . 10 ⁻⁷
Mg ²⁺	5,55 . 10 ⁻²	Al(OH) ₄ ⁻	3,71 . 10 ⁻⁷
SO ₄ ²⁻	2,76 . 10 ⁻²	Ba ²⁺	2,18 . 10 ⁻⁷
Ca ²⁺	9,98 . 10 ⁻³	Fe(OH) ₄ ⁻	1,79 . 10 ⁻⁷
K ⁺	9,72 . 10 ⁻³	Zn ²⁺	1,53 . 10 ⁻⁷
HCO ₃ ⁻	2,23 . 10 ⁻³	Ni ²⁺	1,19 . 10 ⁻⁷
NO ₃ ⁻	1,07 . 10 ⁻³	MoO ₄ ²⁻	1,04 . 10 ⁻⁷
Br ⁻	8,14 . 10 ⁻⁴	CuOH ⁻	4,72 . 10 ⁻⁸
B(OH) ₄ ⁻	4,26 . 10 ⁻⁴	H ₂ AsO ₄ ⁻	4,00 . 10 ⁻⁸
Si(OH) ₄ ⁻	1,07 . 10 ⁻⁴	HVO ₄ ²⁻	3,93 . 10 ⁻⁸
Sr ²⁺	9,13 . 10 ⁻⁵	Mn ²⁺	3,64 . 10 ⁻⁸
F ⁻	6,32 . 10 ⁻⁵	Ti(OH) ₄ ⁰	2,09 . 10 ⁻⁸
Li ⁺	2,45 . 10 ⁻⁵	UO ₂ (CO ₃) ₂ ⁴⁻	1,26 . 10 ⁻⁸
HPO ₄ ²⁻	2,26 . 10 ⁻⁶	Co ²⁺	6,79 . 10 ⁻⁹

A quantidade total dos macroelementos pode variar em certos locais nos oceanos, ocasionando diferentes salinidades, porém a proporção entre os íons permanece constante (WILSON, 1975). Pequenas variações podem ser detectadas nas proporções de cálcio, bicarbonato e magnésio, as quais são afetadas por processos biológicos e hidrotermais (OPEN UNIVERSITY COURSE TEAM, 1989).

O cloro e o sódio são respectivamente o ânion e o cátion mais abundantes na água do mar. Estes íons são responsáveis pela manutenção da neutralidade elétrica

dos crustáceos; o Na^+ é trocado pelo NH_4^+ ou H^+ e o Cl^- pelo HCO_3^- (LINDA & LINDA, 1983). Segundo MORRITT (1989) o sódio é um elemento importante na manutenção da pressão osmótica da hemolinfa de anfípodes.

O magnésio mantém-se internamente no organismo em concentrações muito abaixo daquela observada na água do mar. Segundo KINNE (1964), os animais dos gêneros *Carcinus*, *Portunus*, *Nephrops*, *Palaemon* e *Pachygrapsus*, que são muito ativos, geralmente mantêm baixas concentrações de Mg^{2+} em relação ao meio externo. Provavelmente, os crustáceos apresentam uma capacidade fisiológica bastante desenvolvida no sentido de reduzir a captação deste íon ou então de expeli-lo (MORRITT, 1989; MORRITT & SPICER, 1993).

O Mg^{2+} exerce importantes funções fisiológicas como a de cofator enzimático e a de modulador da hemocianina. Este íon também atua na junção neuromuscular dos crustáceos (LINDA & LINDA, 1983; MORRITT & SPICER, 1993). Altos níveis de magnésio afetaram a atividade muscular e nervosa do *Macrobrachium rosenbergii*, tornando-o inativo (STERN et al., 1987).

O segundo ânion de maior abundância na água do mar é o sulfato. KINNE (1964) e MORRITT (1989) observaram que os crustáceos mantêm baixas concentrações deste íon na hemolinfa em relação ao meio.

O elemento cálcio é de fundamental importância na formação do exoesqueleto (SVERDRUP et al., 1942; MORRITT, 1989). Estudos realizados por BRANNON & RAO (1979) com *Palaemonetes pugio*, indicaram que o depósito de Ca^{2+} na carapaça inicia-se

imediatamente após a ecdise. Para SARDÀ et al. (1989) os organismos que possuem exoesqueleto calcificado, normalmente, apresentam uma alta atividade metabólica após a ecdise para a calcificação da nova carapaça.

A mineralização do exoesqueleto ocorre por meio da reabsorção dos sais da exuvia e da penetração de elementos do meio externo (SARDÀ et al., 1989), enquanto a cutícula permanece permeável (GIBBS & BRYAN, 1972).

BRANNON & RAO (1979) observaram em seus estudos, que além do cálcio, o estrôncio e o bário, também, ficavam depositados no exoesqueleto. GIBBS & BRYAN (1972) supõem que o estrôncio seja absorvido da água do mar juntamente com o Ca^{2+} e incorporado como depósito no exoesqueleto.

Os íons bivalentes, especialmente o Ca^{2+} e Mg^{2+} , afetam propriedades funcionais que ligam o oxigênio à hemocianina (MORRITT, 1989). Segundo Zatta (1984 in ZATTA, 1985) a hemocianina pode atuar como uma proteína transportadora de íons metais da hemolinfa para os locais de utilização metabólica. O aumento da concentração destes cátions na hemolinfa resulta no decréscimo da afinidade do oxigênio ao pigmento respiratório dos crustáceos (MORRITT & SPICER, 1993).

O potássio é o cátion presente em quarto lugar, em termos de quantidade, na água do mar (SVERDRUP et al., 1942) e de acordo com GUZMÁN (1994) é o elemento mais abundante dos músculos dos peixes marinhos.

MORRITT (1989) verificou que o anfípode da espécie *Orchestia gammarellus* apresentou altas concentrações de Ca^{2+} e K^+ na hemolinfa em relação ao meio. No

entanto, KINNE (1964) evidenciou que animais do gênero *Homarus* continham baixos níveis de potássio no organismo.

Para Spaargaren & Ceccaldi (1984 in ZATTA, 1985) os cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ e K^+ são componentes estruturais e, também, responsáveis por muitas funções fisiológicas, como a osmorregulação em crustáceos.

Os microelementos e elementos traços estão presentes em quantidades muito pequenas nos organismos. No entanto, a falta ou o excesso destes elementos no meio de cultivo pode levar à mortalidade ou morbidez (Bernard, 1977 in DEPLEDGE, 1989).

A adição de micronutrientes em uma formulação pode ser benéfica para o desenvolvimento de larvas de certos invertebrados marinhos que são mais dependentes do meio nesta fase da vida (BIDWEEL & SPOTTE, 1985).

Segundo ESTEVES (1988) e RAINBOW (1988) os termos metais traços e metais pesados são usados como sinônimos. Estes são subdivididos em duas categorias biológicas: os essenciais, requeridos em pequenas concentrações para o metabolismo e os não-essenciais, cujas funções metabólicas são desconhecidas (RAINBOW, 1992).

Os metais traços dissolvidos na água do mar estão presentes em diferentes formas químicas complexadas inorgânicas e orgânicas, além do íon livre. Esta última, muitas vezes, apresenta-se em baixas porcentagens do total dissolvido. No entanto, é nesta forma que o elemento está biodisponível. A biodisponibilidade do elemento traço varia com os fatores físicos e químicos do ambiente, como a salinidade e a presença ou não de agentes quelantes (RAINBOW, 1992).

O metabolismo normal dos organismos aquáticos depende da presença dos elementos traços essenciais (KRISHNAJA et al., 1987), na forma metabólica disponível e em concentrações suficientes para atender a demanda fisiológica (RAINBOW, 1990). Estes desempenham diversas funções bioquímicas importantes para os crustáceos, como cofatores em reações enzimáticas ou têm funções estruturais (GILLES & PEQUEUX, 1983; RAINBOW, 1990; 1992).

KRISHNAJA et al. (1987) e ESTEVES (1988) observaram que poluentes industriais e agrícolas, em alguns casos, têm elevado os níveis naturais de alguns elementos metais no ambiente aquático. RAINBOW (1992) verificou que concentrações elevadas de metais essenciais ou não-essenciais podem afetar nocivamente o metabolismo dos organismos aquáticos. No entanto, este mesmo autor encontrou altos níveis destes metais, nos tecidos de organismos marinhos, na forma não tóxica, a qual evita a real ação nociva. Este excesso permanece metabolicamente indisponível na forma de grânulos ou depósitos inorgânicos ricos em metais. O potencial tóxico persistirá se as concentrações excederem esta capacidade fisiológica de neutralizar o efeito nocivo.

ZATTA (1985) observou elevadas concentrações de metais no exoesqueleto de *Carcinus maenas*; provavelmente, o excesso desses elementos seja eliminado na exúvia durante a muda.

RAINBOW & WHITE (1989; 1990) afirmam que os decápodes apresentam a capacidade de regular os níveis de certos elementos traços no organismo, o que não

foi observado em outros crustáceos.

Segundo KINNE (1964) e LINDA & LINDA (1983) as brânquias, o intestino e as glândulas antenais são os órgãos fundamentais no mecanismo de regulação iônica dos invertebrados. As brânquias dos crustáceos atuam nas trocas gasosas, no balanço ácido-básico, no transporte dos íons e na excreção de produtos nitrogenados; estando estas funções interligadas (SIERBERS et al., 1989).

A absorção de íons ocorre principalmente nas brânquias e o transporte pode se dar de forma ativa ou passiva. Normalmente, os metais alcalinos como sódio, potássio, magnésio e cálcio requerem gasto de energia para serem absorvidos. No entanto, os elementos traços entram passivamente no organismo (RAINBOW, 1990; 1992). A absorção passiva desses elementos ocorre, também, na superfície corporal das larvas e durante o processo de muda em crustáceos adultos, devido à maior permeabilidade do exoesqueleto (RAINBOW, 1988; 1990).

As glândulas antenais estão envolvidas nos processos de balanceamento de água e de sais nos crustáceos (LINDA & LINDA, 1983). KINNE (1964) observou que a glândula antenal de muitos crustáceos marinhos retinha o potássio e o cálcio e eliminava o excesso de magnésio e sulfato.

A entrada de elementos traços nos crustáceos pode ocorrer, basicamente, por duas vias: a ligação do íon com uma proteína transportadora da membrana celular (o íon é transferido passivamente para dentro da célula epitelial e depois difunde-se no organismo) e a entrada accidental, durante o transporte ativo dos macroelementos (RAINBOW et al., 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia de Crustáceos do Departamento de Biologia Aplicada da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, associado ao CAUNESP, campus de Jaboticabal.

O experimento foi conduzido conforme o teste de inanição desenvolvido por COOPER & HEINEN (1991). Este consiste basicamente na estocagem de larvas de *M. rosenbergii*, no segundo estágio larval, em béqueres de 30 ml, contendo 15 ml de água salobra, mantidos em temperatura ambiente constante.

O estágio II foi escolhido porque é atingido no segundo dia após a eclosão, facilitando a obtenção das larvas. Animais no estágio I mudam rapidamente, originando uma amostra mais heterogênea, e apresentam maior tolerância as variações de salinidade. Assim, sua utilização foi descartada.

As larvas em condições ótimas de sobrevivência gastam uma quantidade mínima de energia para manter seu metabolismo basal. Em estado de inanição, devem levar mais tempo para morrer em meios mais adequados ao seu desenvolvimento. Portanto, o tempo de vida deve refletir o efeito do meio sobre o

metabolismo. A mortalidade mais rápida indica a presença de fatores de estresse e o tempo de vida será menor quanto maior for o efeito negativo desses fatores sobre as larvas.

3.1. Preparação da água do mar artificial.

A água do mar artificial foi preparada conforme a formulação adaptada de BIDWELL & SPOTTE (1985), cujos sais são classificados em macroelementos (MA), microelementos (MI) e elementos traços (ET). Esta é apresentada na Tabela 2.

O preparo da água do mar artificial seguiu a metodologia de SPOTTE (1979) que consiste basicamente na pesagem e dissolução separada dos solutos componentes da fórmula. Os sais utilizados apresentavam grau de pureza P.A.

A água salgada foi diluída com água deionizada até a salinidade de 12‰. Na preparação da água salobra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$V_s = \frac{V_d \times 12\text{‰}}{S}$$

onde:

V_s = volume de água salgada

V_d = volume de água salobra desejado

S = salinidade da água salgada

Os sais microelementos e os traços, que entram na formulação da água artificial em pequenas quantidades, foram primeiramente dissolvidos em água,

usando balões volumétricos, e posteriormente acrescidos à solução final com auxílio de uma pipeta volumétrica.

3.2. Fases do experimento.

O trabalho consistiu de cinco etapas realizadas sequencialmente, que foram denominadas de Fase 1, Fase 2, Fase 3, Fase 4 e Fase 5.

Na fase 1 e 2 do experimento foram avaliados seis e sete tratamentos, respectivamente, (Tabelas 3 e 4) com água salobra de diferentes composições iônicas em relação aos elementos traços alumínio, rubídeo, zinco, cobalto e cobre.

Os tratamentos da Fase 1 foram formulados com todos os sais MA e MI. O tratamento 1 continha todos os ET e os demais meios retirou-se, por vez, um único sal correspondente aos íons traços Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} , respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2. Macroelementos, microelementos e elementos traços utilizados na preparação da água do mar artificial.

MACROELEMENTOS (MA)	
Sais	g/L de água deionizada
Cloreto de Sódio (NaCl)	27,6
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	6,9
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂ . 6H ₂ O)	5,4
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ . 2H ₂ O)	1,4
Cloreto de Potássio (KCl)	0,6
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	0,2
MICROELEMENTOS (MI)	
Sais	g/L de água deionizada
Brometo de Potássio (KBr)	0,027
Cloreto de Estrôncio (SrCl ₂ . 6H ₂ O)	0,020
Sulfato de Manganês (MnSO ₄ . H ₂ O)	0,004
Fosfato de Sódio (Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O)	0,004
Cloreto de Lítio (LiCl)	0,001
Molibdato de Sódio (Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O)	0,001
Tiosulfato de Sódio (Na ₂ S ₂ O ₃ . 5H ₂ O)	0,001
ELEMENTOS TRAÇOS (ET)	
Sais	g/L de água deionizada
Sulfato de Alumínio [Al ₂ (SO ₄) ₃ . 18 H ₂ O]	8,6 x 10 ⁻⁴
Cloreto de Rubídio (RbCl)	1,5 x 10 ⁻⁴
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ . 7 H ₂ O)	1,0 x 10 ⁻⁴
Sulfato de Cobalto (CoSO ₄ . 7 H ₂ O)	9,0 x 10 ⁻⁵
Sulfato de Cobre II (CuSO ₄ . 5H ₂ O)	1,0 x 10 ⁻⁵

Tabela 3. Tratamentos da Fase 1

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS
Tratamento 1	completa: MA + MI + ET
Tratamento 2	MA + MI + [ET - Al ₂ (SO ₄) ₃]
Tratamento 3	MA + MI + (ET - RbCl)
Tratamento 4	MA + MI + (ET - ZnSO ₄)
Tratamento 5	MA + MI + (ET - CoSO ₄)
Tratamento 6	MA + MI + (ET - CuSO ₄)

+ → adicionou-se

- → retirou-se

Na Fase 2, os tratamentos também continham na sua composição todos os sais MA e MI. Os tratamentos 1 e 7 foram formulados com todos os íons traços e sem eles, respectivamente. O restante dos tratamentos foram preparados adicionando-se, por vez, um único sal da série dos ET, na sequência: Al, Rb, Zn, Co e Cu (Tabela 4).

Tabela 4. Tratamentos da Fase 2

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS
Tratamento 1	completa: MA + MI + ET
Tratamento 2	MA + MI + Al ₂ (SO ₄) ₃
Tratamento 3	MA + MI + RbCl
Tratamento 4	MA + MI + ZnSO ₄
Tratamento 5	MA + MI + CoSO ₄
Tratamento 6	MA + MI + CuSO ₄
Tratamento 7	MA + MI

+ → adicionou-se

As duas etapas seguintes avaliaram as águas salobras de diferentes formulações em relação aos íons bromo, estrôncio, manganês, fosfato, lítio, molibdato e tiosulfato, correspondentes aos sais da série MI.

Na fase 3 e 4 foram testados nove meios. Em ambas, o tratamento 1 continha na sua composição todos os sais MA e MI, e o tratamento 9 apenas os MA. Os outros tratamentos, destas Fases, foram formulados com todos os sais macroelementos. No entanto, para a avaliação dos microelementos, na terceira fase, os meios tiveram um único íon retirado, por vez, da série dos MI na sequência: Br⁻, Sr²⁺, Mn²⁺, HPO₄²⁻, Li⁺, MoO₄²⁻ e S₂O₃²⁻, enquanto que na Fase 4 foram um por vez adicionados (Tabelas 5 e 6).

Na última etapa ou Fase 5 foram analisados cinco meios com diferentes composições em relação aos íons Ca²⁺, K⁺, HCO₃⁻ e Br⁻. O tratamento 1 formulou-se com todos os sais da série MA e mais o brometo de potássio. Nos demais meios foram, por vez, retirados os sais correspondentes aos elementos cálcio, potássio, bicarbonato e brometo, respectivamente (Tabela 7).

A retirada do cátion ou ânion ligado ao íon testado foi considerada desprezível, pois a redução em sua concentração foi, em média, da ordem de 0,0007% para os traços, 0,02% para os microelementos e 1,3% para os macroelementos.

Tabela 5. Tratamentos da Fase 3

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS
Tratamento 1	MA + MI
Tratamento 2	MA + (MI - KBr)
Tratamento 3	MA + (MI - SrCl ₂)
Tratamento 4	MA + (MI - MnSO ₄)
Tratamento 5	MA + (MI - Na ₂ HPO ₄)
Tratamento 6	MA + (MI - LiCl)
Tratamento 7	MA + (MI - Na ₂ MoO ₄)
Tratamento 8	MA + (MI - Na ₂ S ₂ O ₃)
Tratamento 9	MA

+ → adicionou-se

- → retirou-se

Tabela 6. Tratamentos da Fase 4

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS
Tratamento 1	MA + MI
Tratamento 2	MA + KBr
Tratamento 3	MA + SrCl ₂
Tratamento 4	MA + MnSO ₄
Tratamento 5	MA + Na ₂ HPO ₄
Tratamento 6	MA + LiCl
Tratamento 7	MA + Na ₂ MoO ₄
Tratamento 8	MA + Na ₂ S ₂ O ₃
Tratamento 9	MA

+ → adicionou-se

Tabela 7. Tratamentos da Fase 5

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS
Tratamento 1	MA + KBr
Tratamento 2	MA - CaCl ₂ + KBr
Tratamento 3	MA - KCl + KBr
Tratamento 4	MA - NaHCO ₃ + KBr
Tratamento 5	MA

+ → adicionou-se

- → retirou-se

Os frascos de sais utilizados na formulação da água do mar artificial apresentam em seus rótulos as quantidades máximas de impurezas, o que possibilitou verificar que alguns elementos traços e microelementos presentes na fórmula podem fazer parte das impurezas de outros sais. A concentração máxima possível em g/L, de cada um destes elementos contaminadores, foi calculada multiplicando-se o seu percentual máximo de ocorrência pela quantidade do sal contaminado utilizado no preparo da água do mar artificial. A quantidade do íon contaminador foi, posteriormente, dividida pela sua respectiva concentração na fórmula da água do mar sintética. Desta forma, obteve-se os percentuais máximos de contaminação (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração na fórmula da água do mar artificial, concentração como impureza e respectivo percentual máximo de ocorrência dos íons contaminadores de outros sais.

Íon	Concentração (g/L)		%
	fórmula	impureza máxima	
Zn ²⁺	2,27 x 10 ⁻⁵	4,40 x 10 ⁻⁷	1,9
Cu ²⁺	2,54 x 10 ⁻⁶	1,00 x 10 ⁻⁸	0,4
Br ⁻	8,87 x 10 ⁻³	6,00 x 10 ⁻⁵	0,7
Sr ²⁺	6,57 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻³	30,4
Mn ²⁺	1,30 x 10 ⁻³	6,15 x 10 ⁻⁵	4,7

3.3. Obtenção das larvas e montagem do experimento.

As larvas utilizadas em cada etapa do experimento foram obtidas a partir de uma fêmea ovada de *M. rosenbergii*, com ovos em fase final de desenvolvimento embrionário, capturada do estoque de reprodutores do Setor de Carcinicultura do CAUNESP.

Cada fêmea foi levada ao laboratório e colocada em caixa de polietileno, pintada de preto com uma extremidade branca, contendo cerca de 20 litros de água, que foi aerada por meio de uma pedra porosa ligada ao sistema de aeração do laboratório. Nas Fases 1 a 4 as larvas eclodiram em água salobra artificial com composição iônica comum a todos os tratamentos. Desta forma, evitou-se qualquer contaminação dos tratamentos com a água de eclosão. Na Fase 5 o único sal comum a todos os tratamentos era o NaCl. No entanto, o meio de eclosão preparado, apenas,

com este sal provocou a total mortalidade das larvas. Nesta fase utilizou-se, portanto, água doce filtrada para eclosão das larvas.

Durante o período que a fêmea permaneceu na caixa não foi fornecido alimento; diariamente, pela manhã, as fezes foram sifonadas e cerca de 5% do volume de água renovado.

A caixa de eclosão foi coberta por um pano preto e colocou-se uma luminária na extremidade branca, quando foi constatada a presença de larvas. Estas migram em direção à luz devido à fototaxia positiva, facilitando sua coleta .

Após 10 minutos, centenas de larvas foram sifonadas para um béquer de polietileno de dois litros, onde permaneceram por dois dias até que todas atingissem o 2º estágio larval. Neste período, as larvas mortas foram sifonadas e renovou-se aproximadamente 200 ml de água. As larvas não receberam qualquer tipo de alimento.

Para a montagem do experimento, a luminária foi novamente utilizada para a atração das larvas sadias e ativas. Estas foram cuidadosamente lavadas com água do próprio tratamento sobre uma malha de 125 μm , e então colocadas, com ajuda de uma pipeta Pasteur, em béqueres de vidro de 30 ml contendo água. Todos os tratamentos apresentaram três repetições (três béqueres) com seis larvas no estágio II em cada béquer.

Os béqueres ficaram dispostos sobre uma mesa forrada com uma lona plástica preta para minimizar o reflexo da luz nos recipientes e, assim, evitar a

aglomeração das larvas, devido ao fototactismo positivo. Estes foram cobertos com plástico transparente para evitar a contaminação da água com poeira.

3.4. Coleta de dados.

A cada oito horas contou-se o número de larvas vivas em cada unidade experimental. Portanto, diariamente realizaram-se três observações, às 7:00, 15:00 e 23:00 horas.

As larvas que não apresentavam motilidade à olho nu foram colocadas em placa de Petri, utilizando-se de pipeta Pasteur, e examinadas sob lupa (Wild - Leitz M3Z) para comprovar a morte e observar o estado geral destas. As larvas mortas foram desprezadas e aquelas que ainda possuíam algum indício de vida, como batimentos cardíacos ou movimentos dos maxilípedes, foram recolocadas em seus respectivos béqueres e contadas como larvas vivas. As pipetas Pasteur e as placas de Petri foram marcadas e individualizadas para cada tratamento, evitando-se possíveis contaminações. Delimitaram-se as placas de Petri com caneta de retroprojeter em três porções, que correspondiam às repetições. Desta forma as observações foram agilizadas.

O tempo médio de vida foi calculado para cada parcela, usando a expressão:

$$T_s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n T_{si}$$

onde:

Ts = tempo médio de vida

Tsi = número de horas de vida da larva i

n = número de larvas no béquer.

Os parâmetros da água monitorados foram: temperatura, salinidade e pH. A temperatura e a luminosidade da sala de cultivo também foram controlados.

A temperatura da água foi determinada por meio de um termômetro comum com coluna de mercúrio colocado dentro de um béquer contendo 15 ml de água, igual aos utilizados nos tratamentos. As medições foram feitas todos os dias às 15 horas.

As temperaturas máxima e mínima do ar da sala de cultivo foram monitoradas todos os dias utilizando-se de um termômetro colocado próximo às parcelas. Quando necessário, regulou-se os condicionadores de ar para manter a temperatura em torno de 30°C.

A salinidade foi verificada diariamente por meio de um refratômetro Atago S/Mill-E 0-100 ‰, no período da manhã. A água retirada juntamente com as larvas mortas ou resíduos de exuvias foi repostada com água do tratamento, estocada em recipiente de vidro tampado de 450 ml. Utilizou-se água deionizada para repor a que evaporou, mantendo-se a salinidade em torno de 12‰.

O pH foi determinado, com auxílio de um peagômetro, em todos os meios antes da montagem do experimento. No final, mediu-se o pH de todas as repetições para obter-se a média de cada tratamento.

Foi mantido um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, por meio de um timer.

3.5. Delineamento experimental e análise dos dados.

Em todas as Fases do trabalho utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado para a análise estatística do tempo médio de vida. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey.

Foram construídas curvas de sobrevivência, lançando-se em gráfico o número médio de larvas vivas em função das horas de observação.

4 . RESULTADOS

Na Fase 1, o tempo médio de vida das larvas variou de 77 a 93 horas e não diferiu significativamente entre os tratamentos (Tabela 9). Os meios formulados sem os elementos traços alumínio e rubídeo apresentaram, respectivamente, a maior e a menor média de sobrevivência.

Tabela 9 . Tempo médio de vida das larvas nos tratamentos da Fase 1.

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS	MÉDIAS (horas)	Ep.
Tratamento 2	MA + MI + [ET - Al ₂ (SO ₄) ₃]	93 a	1
Tratamento 4	MA + MI + (ET - ZnSO ₄)	90 a	5
Tratamento 1	completa: MA + MI + ET	82 a	3
Tratamento 6	MA + MI + (ET - CuSO ₄)	80 a	4
Tratamento 5	MA + MI + (ET - CoSO ₄)	78 a	5
Tratamento 3	MA + MI + (ET - RbCl)	77 a	3
Coeficiente de variação = 8%		Ep = erro padrão	

médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

+ → adicionou-se

- → retirou-se

Na Figura 1 observa-se que as curvas de sobrevivência das larvas nos seis tratamentos da primeira Fase assemelham-se, coincidindo com os resultados da análise estatística.

A Tabela 10 indica que o tempo médio de vida das larvas não diferiu significativamente entre os tratamentos da Fase 2. O número médio de horas de vida variaram de 80 a 99. O meio contendo todos os íons traços proporcionou maior tempo de vida para as larvas, e o tratamento 5, que recebeu apenas o íon Co^{2+} como elemento traço, obteve a menor média de sobrevivência. O meio do tratamento 7 foi preparado sem a inclusão de qualquer elemento traço e estatisticamente não diferiu do meio completo (tratamento 1).

Tabela 10. Tempo médio de vida das larvas nos tratamentos da Fase 2.

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS	MÉDIAS (horas)	Ep.
Tratamento 1	completa: MA + MI + ET	99 a	3
Tratamento 2	MA + MI + $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	98 a	2
Tratamento 4	MA + MI + ZnSO_4	94 a	1
Tratamento 6	MA + MI + CuSO_4	92 a	7
Tratamento 3	MA + MI + RbCl	91 a	4
Tratamento 7	MA + MI	88 a	5
Tratamento 5	MA + MI + CoSO_4	80 a	6
Coeficiente de variação = 9%		Ep. = erro padrão	

médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

+ → adicionou-se

A tendência das curvas de sobrevivência na segunda etapa do experimento, segue uma trajetória semelhante em todos os tipos de água (Figura 2).

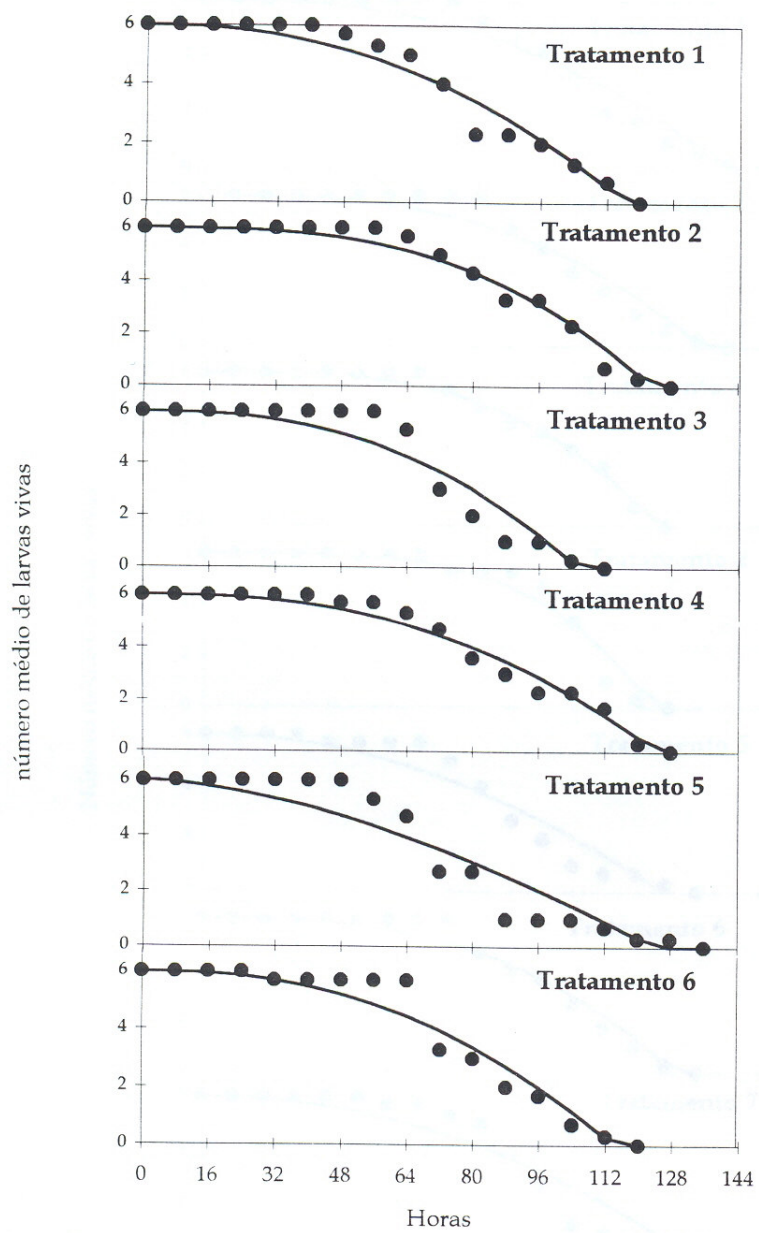


Figura 1. Curvas de sobrevivência obtidas para os seis tratamentos da Fase 1.

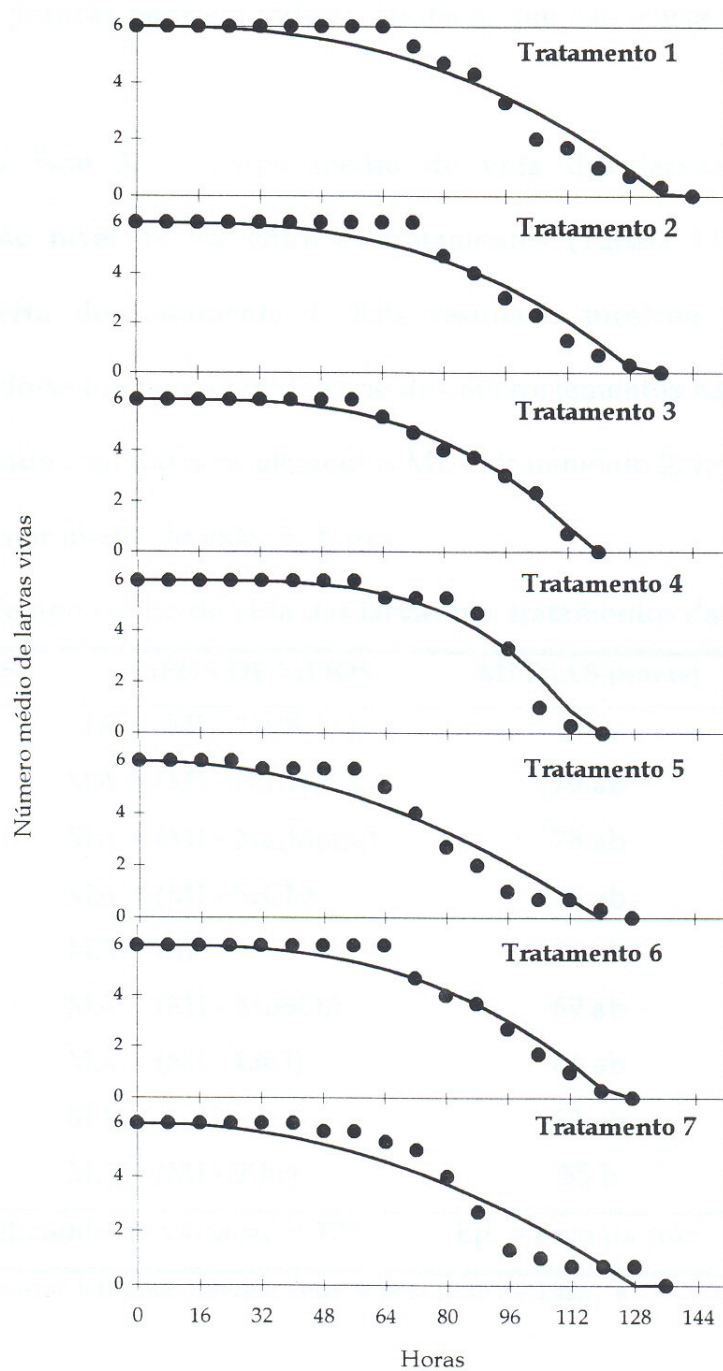


Figura 2. Curvas de sobrevivência obtidas para os sete tratamentos da Fase 2.

As representações gráficas parecem indicar, também, que não existe diferença entre os tratamentos.

Na Fase 3, o tempo médio de vida das larvas foi diferente significativamente ao nível de 5% entre os tratamentos (Tabela 11). No entanto, nenhum deles diferiu do tratamento 1. Este resultado mostrou que os meios formulados excluindo-se um único íon da série dos microelementos não diferiram do tipo de água preparado com todos os elementos MI. O tratamento 2, formulado sem o íon Br⁻, obteve a menor média de vida, 55 horas.

Tabela 11 . Tempo médio de vida das larvas nos tratamentos da Fase 3.

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS	MÉDIAS (horas)	Ep.
Tratamento 8	MA + (MI - Na ₂ S ₂ O ₃)	80 a	2
Tratamento 5	MA + (MI - Na ₂ HPO ₄)	79 ab	4
Tratamento 7	MA + (MI - Na ₂ MoO ₄)	78 ab	8
Tratamento 3	MA + (MI - SrCl ₂)	78 ab	5
Tratamento 1	MA + MI	69 ab	3
Tratamento 4	MA + (MI - MnSO ₄)	69 ab	7
Tratamento 6	MA + (MI - LiCl)	66 ab	1
Tratamento 9	MA	62 ab	6
Tratamento 2	MA + (MI - KBr)	55 b	3
Coeficiente de variação = 12%		Ep. = erro padrão	

médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

+ → adicionou-se

- → retirou-se

Os gráficos dos tratamentos 2 e 9 da Fase 3 (Figura 3) apresentam curvas de sobrevivência com declividade mais acentuada em relação aos outros tratamentos. Observa-se, neste dois gráficos, que em 56 horas mais da metade das

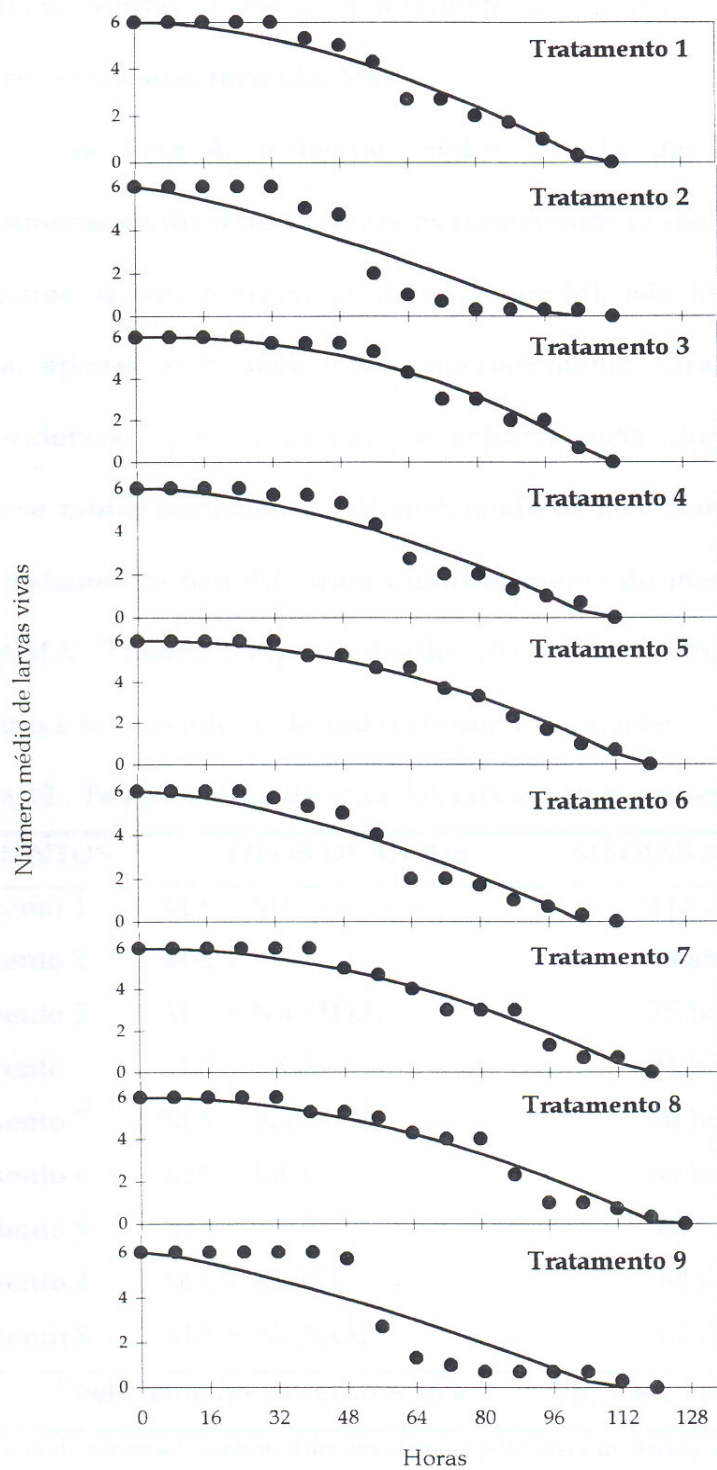


Figura 3. Curvas de sobrevivência obtidas para os nove tratamentos da Fase 3.

larvas estavam mortas. Estes dois tratamentos têm em comum a ausência do elemento bromo em suas formulações.

Na Fase 4, o tempo médio e vida das larvas foi diferente significativamente ao nível de 1% entre os tratamentos (Tabela 12). O tratamento 1, contendo todos os íons representados pelos sais MI, não diferenciou-se do meio que incluía, apenas, o brometo como microelemento. Graficamente, também é possível evidenciar que as curvas de sobrevivência dos tratamentos 1 e 2 mostraram-se muito semelhantes, diferenciando-se dos demais meios (Figura 4). Os outros tratamentos não diferiram estatisticamente do meio preparado somente com os sais MA. O menor tempo médio de vida das larvas foi obtida no tratamento 8, que incluiu o sal tiosulfato de sódio em sua formulação.

Tabela 12 . Tempo médio de vida das larvas nos tratamentos da Fase 4.

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS	MÉDIAS (horas)	Ep.
Tratamento 1	MA + MI	111 a	8
Tratamento 2	MA + KBr	99 ab	8
Tratamento 5	MA + Na ₂ HPO ₄	75 bc	2
Tratamento 3	MA + SrCl ₂	71 bc	5
Tratamento 7	MA + Na ₂ MoO ₄	70 bc	14
Tratamento 6	MA + LiCl	66 bc	5
Tratamento 9	MA	64 c	4
Tratamento 4	MA + MnSO ₄	63 c	6
Tratamento 8	MA + Na ₂ S ₂ O ₃	61 c	3

Coeficiente de variação = 16% Ep. = erro padrão

médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.+ → adicionou-se

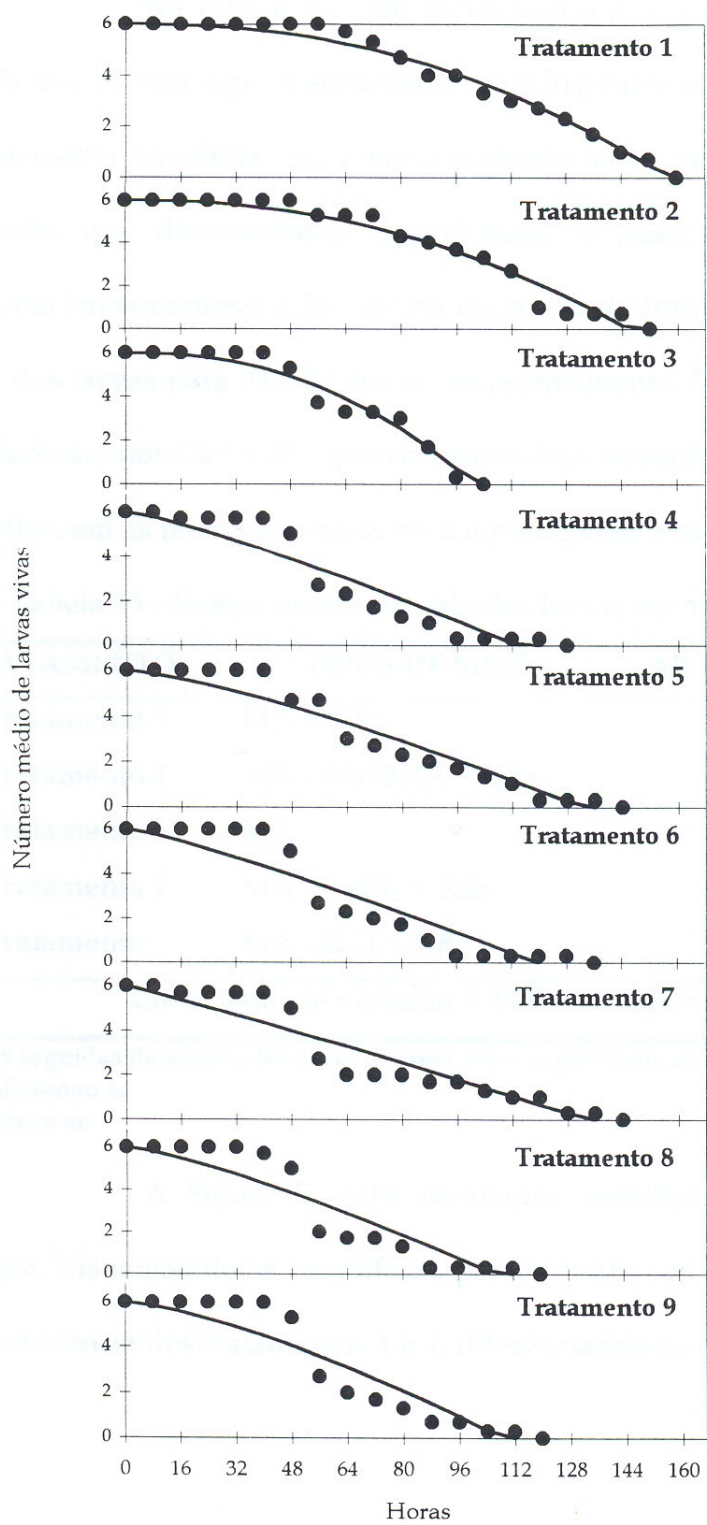


Figura 4. Curvas de sobrevivência obtidas para os nove tratamentos da Fase 4.

Na última Fase do experimento o número médio de horas de vida das larvas diferiu significativamente ($P < 0,01$) entre os tratamentos (Tabela 13). A maior média foi obtida com o meio contendo todos os elementos macro mais o íon brometo, que diferenciou-se dos demais. A ausência dos íons bicarbonato e brometo (tratamentos 4 e 5) fizeram decrescer de forma significativa as médias de vida das larvas para 94 e 54 horas, respectivamente. Os meios formulados sem os macroelementos Ca^{2+} e K^+ , que correspondem respectivamente aos tratamentos 2 e 3, obtiveram as menores médias no tempo de vida e não diferiram entre si.

Tabela 13 . Tempo médio de vida das larvas nos tratamentos da Fase 5.

TRATAMENTOS	TIPOS DE MEIOS	MÉDIAS (horas)	Ep.
Tratamento 1	MA + KBr	113 a	5
Tratamento 4	MA - NaHCO_3 + KBr	94 b	3
Tratamento 5	MA	54 c	6
Tratamento 2	MA - CaCl_2 + KBr	35 d	0
Tratamento 3	MA - KCl + KBr	34 d	1
Coeficiente de variação = 11%		Ep. = erro padrão	

médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

+ → adicionou-se

- → retirou-se

A Figura 5 exibe resultados semelhantes aos obtidos na análise estatística. Visualizando-se os gráficos, parece existir uma semelhança entre as curvas de sobrevivência dos tratamentos 1 e 4, diferenciando-se dos outros tipos de meio.

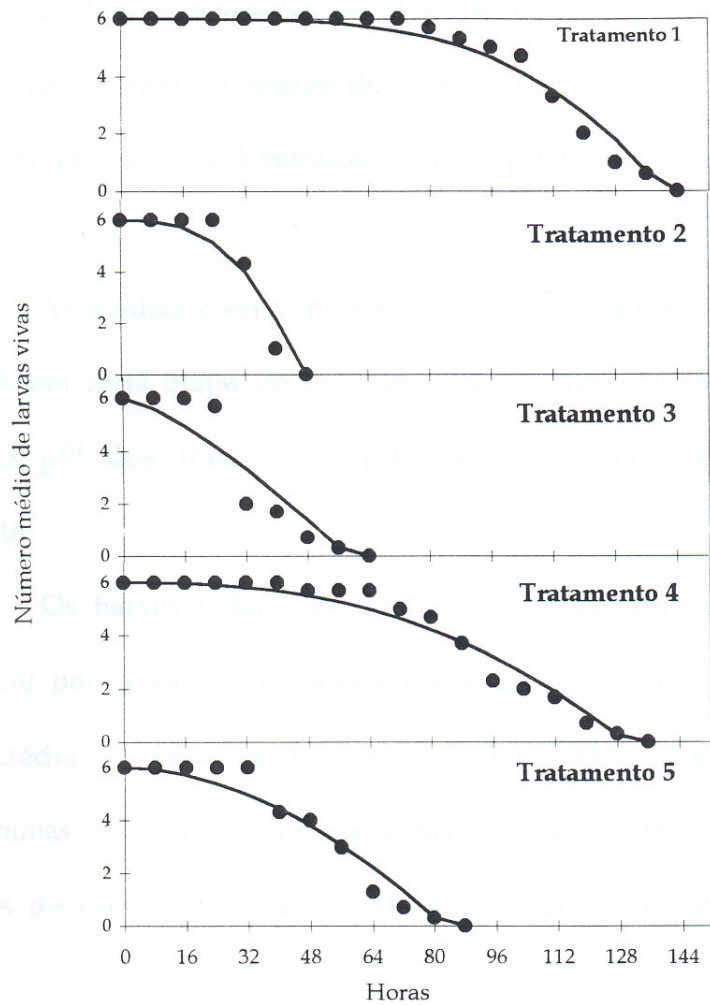


Figura 5. Curvas de sobrevivência obtidas nos cinco tratamentos da fase 5.

Observa-se que as larvas mantidas em um meio ausente de bromo (gráfico do tratamento 5) apresentaram um tempo de vida menor em relação aos tratamentos 1 e 4. Porém, nos tratamentos 2 e 3 retratou-se uma queda brusca na sobrevivência das larvas.

As médias e erros padrão para as temperaturas da água e do ar na sala de cultivo, em cada etapa do experimento, são apresentadas na Tabela 14 e a salinidade e o pH dos tratamentos estão representadas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Os baixos valores de erro padrão mostram que a temperatura da água apresentou pouca variação durante a realização de cada Fase do trabalho. A temperatura média da água oscilou entre 28,5 e 30,1°C. As temperaturas médias máximas e mínimas do ar mantiveram-se acima de 30,4 e 28,0°C, respectivamente. Os baixos valores de erro padrão demonstram a estabilidade térmica do ambiente (Tabela 14).

Tabela 14. Temperatura da água e temperaturas máxima e mínima do ar na sala de cultivo em cada fase do experimento.

Temperatura	Fases									
	1		2		3		4		5	
	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.
da água	29,0°C	0,1	29,1°C	0,2	29,4°C	0,2	28,5°C	0,2	30,1°C	0,2
do ar										
máxima	31,3°C	0,2	30,5°C	0,3	31,1°C	0,2	30,4°C	0,3	31,8°C	0,3
mínima	29,4°C	0,2	28,5°C	0,3	28,8°C	0,2	28,0°C	0,2	29,3°C	0,4

Ep. = erro padrão.

A Tabela 15 apresenta as médias de salinidade de cada tratamento nas fases do experimento. Observa-se que este parâmetro permaneceu ao redor de 12‰.

Tabela 15. Salinidade média dos tratamentos em cada fase do experimento.

Tratamentos	Fases									
	1		2		3		4		5	
	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.	Média	Ep.
1	11,7	0,1	12,0	0,1	12,2	0,1	11,9	0,1	11,9	0,0
2	11,9	0,0	12,0	0,0	12,2	0,2	11,9	0,1	11,7	0,2
3	11,6	0,1	11,9	0,1	12,2	0,1	11,5	0,2	11,9	0,2
4	11,4	0,1	11,7	0,1	12,3	0,1	11,6	0,2	12,0	0,0
5	11,6	0,1	11,8	0,1	12,3	0,1	11,9	0,2	11,9	0,0
6	11,8	0,1	11,8	0,1	12,2	0,1	12,0	0,1	-	-
7	-	-	12,0	0,0	12,0	0,1	11,8	0,1	-	-
8	-	-	-	-	12,0	0,1	11,5	0,1	-	-
9	-	-	-	-	12,1	0,1	11,9	0,1	-	-

Ep. = erro padrão

O pH inicial dos tratamentos em todas as etapas manteve-se entre 7,6 e 8,1, caracterizando a água como ligeiramente alcalina. Somente o meio sem bicarbonato de sódio (tratamento 4) da fase 5 apresentou valor mais baixo de pH. As médias finais dos tratamentos não diferiram muito dos valores de pH iniciais (Tabela 16).

Tabela 16. Valores iniciais e médias finais de pH dos tratamentos em cada fase do experimento.

Tratamentos	Fases									
	1		2		3		4		5	
	Início	Final*	Início	Final*	Início	Final*	Início	Final*	Início	Final*
1	7,7	7,8	8,1	8,0	8,0	8,0	8,1	7,9	7,6	7,8
2	7,7	7,8	8,1	8,0	8,0	7,9	8,1	7,9	7,7	7,8
3	7,6	7,8	8,1	7,9	8,0	7,9	8,1	8,1	7,7	7,7
4	7,6	7,8	8,1	7,9	8,0	8,0	8,1	8,1	5,9	6,2
5	7,6	7,9	8,1	7,9	8,0	7,9	8,0	8,1	7,7	7,7
6	7,6	7,9	8,1	7,9	8,0	7,9	8,1	8,1	-	-
7	-	-	8,1	7,9	8,0	7,9	8,0	8,0	-	-
8	-	-	-	-	8,0	7,9	8,0	8,0	-	-
9	-	-	-	-	8,0	8,0	8,0	8,0	-	-

* média das três repetições.

5. DISCUSSÃO

Os elementos traços alumínio, rubídeo, zinco, cobalto e cobre não contribuíram para aumentar o tempo de vida das larvas (Tabelas 9 e 10). A ausência destes íons não provocou estresse às larvas suficiente para acelerar sua morte. Segundo Zarogian et al. (1969 in KINNE, 1976) a adição de elementos traços na formulação da água do mar artificial não foi importante para o desenvolvimento das larvas de *Crassostrea virginica*. No entanto, RAINBOW (1988; 1990) considera essenciais os metais Zn, Cu e Co, que exercem variadas funções bioquímicas, agindo, muitas vezes, como cofatores enzimáticos, sendo fundamental para o metabolismo.

O zinco é um dos elementos mais estudados em crustáceos e é considerado por RAINBOW (1988) o principal metal traço. Este íon é requerido por enzimas carbônicas (anidrase) e, também, exerce funções estruturais (RAINBOW, 1988; 1992). ZATTA (1985) e DEPLEDGE (1989) observaram que uma quantidade considerável de zinco encontra-se na musculatura de crustáceos. Provavelmente, este íon atue nas contrações musculares destes animais.

Segundo SVERDRUP et al. (1942), o cobre é um constituinte

essencial para muitos organismos marinhos; para o desenvolvimento larval de ostras, por exemplo, a presença deste íon parece ser fundamental. O íon Cu^{2+} é um componente importante do pigmento respiratório de crustáceos, a hemocianina (RAINBOW, 1990). Esta é uma macromolécula com alto peso molecular (MANGUM, 1983). Isto pode explicar porque DEPLEDGE (1989) verificou, em seus estudos, que o elemento Cu concentrava-se principalmente na hemolinfa de *Carcinus maenas* e *Palaemon* spp.

Os níveis de zinco e cobre no organismo são mantidos constantes numa concentração próxima da requerida para a demanda biológica. A capacidade de regular os níveis destes elementos parece ser uma característica dos crustáceos decápodes (RAINBOW, 1988; RAINBOW & WHITE, 1989; 1990). Aparentemente, esta habilidade não se estende a todos os elementos traços essenciais; RAINBOW & WHITE (1990) verificaram que o cobalto ficou acumulado no organismo de crustáceos mantidos em meios com alta concentração desse elemento. O excesso de metais traços no organismo de animais aquáticos pode inibir a ação das enzimas Na, K-ATPase, vital para o processo de osmorregulação (HANSEN et al., 1992).

O Zn, Co e Cu acumulados pelos animais durante a fase de ovo foram suficientes para a manutenção dos processos metabólicos das larvas até o estágio II (algumas, inclusive, mudaram para o estágio III antes de morrer). Isto indica que não houve perda significativa desses elementos e a hemocianina não é destruída em quantidade relevante durante os dois primeiros estágios larvais. Portanto as larvas de

M. rosenbergii são capazes de reter íons por certo tempo. A extensão desse período merece ser investigada.

Embora a presença de elementos traços nos diversos meios testados não tenha beneficiado a sobrevivência das larvas neste experimento, mais estudos fisiológicos com todos os estágios larvais devem ser realizados. De acordo com GOMEZ (1987), *M. rosenbergii* tornou-se menos tolerante às mudanças de salinidade e temperatura nos últimos estágios larvais. Parece que tais larvas diminuem sua capacidade de suportar condições adversas do ambiente com o decorrer do desenvolvimento. A carência dos íons Al^{3+} , Rb^{+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} , poderia portanto manifestar-se ao longo da ontogênese das larvas, prejudicando o desenvolvimento normal do *M. rosenbergii*.

Observou-se uma grande diferença no tempo médio de vida das larvas nos tratamentos número 1 (MA + MI) nas Fases 3 e 4, isto pode ser decorrente as diferenças genéticas entre as fêmeas utilizadas.

Os resultados estatísticos e gráficos obtidos nas Fases 3 e 4 evidenciaram a importância do microelemento bromo, na formulação da água do mar artificial, para a sobrevivência das larvas. SILVA (1995) observou que a omissão do íon Br^{-} provocou total mortalidade do *M. rosenbergii* no início do desenvolvimento larval, mesmo fornecendo alimento às larvas. Isto indica que a principal fonte de íon Br^{-} para as larvas é o meio aquático e que estas devem apresentar um mecanismo de absorção desse elemento.

FUNGE - SMITH et al. (1995) detectaram concentrações significativamente altas de bromo na hemolinfa de *M. rosenbergii* adultos em relação ao meio externo, indicando que este íon exerce alguma função específica na fisiologia destes animais. Segundo estes autores, o brometo pode formar complexos de transferência de carga com o íon Cu, podendo afetar as enzimas carregadoras de cobre e os pigmentos, que em crustáceos atuam tanto na respiração quanto na esclerotização do exoesqueleto.

A ausência ou a adição dos demais microelementos, Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} e $S_2O_3^{2-}$ não afetou, significativamente, o tempo de vida das larvas neste experimento. No entanto, FUNGE - SMITH et al. (1995) afirmam que a falta de estrôncio no meio de cultivo reduziu a sobrevivência das larvas de *M. rosenbergii*. Estes mesmos autores observaram mecanismos de regulação de Sr^{2+} em adultos desta espécie e concluíram que este íon pode ser importante para o metabolismo. GIBBS & BRYAN (1972) e BRANNON & RAO (1979) sugeriram que o estrôncio seja absorvido da água do mar, juntamente com o cálcio e incorporado ao exoesqueleto como produto de deposição. Segundo BRANNON & RAO (1979) e SPOTTE (1979), em certas circunstâncias, o cálcio pode ser substituído pelo estrôncio, devido à semelhança química entre estes elementos.

RAINBOW (1988) e RAINBOW & WHITE (1990) afirmam que crustáceos decápodes regulam os níveis de manganês no corpo, considerando, portanto, este íon essencial ao desenvolvimento. O Mn^{2+} encontra-se no organismo,

muitas vezes, relacionado ao cálcio (RAINBOW, 1988). ZATTA (1985) verificou altas concentrações de manganês no exoesqueleto de *Carcinus maenas*.

A carência de Sr^{2+} e Mn^{2+} , nos meios de cultivo testados aqui, pode ter sido compensada pelos estoques acumulados durante as fases de ovo ou pela disponibilidade do macroelemento Ca^{2+} , presente em todos os tratamentos da Fase 3 e 4. Verificou-se que o estrôncio e o manganês podem ser contaminadores de outros sais usados neste trabalho (Tabela 8). Talvez as quantidades adicionadas como impurezas foram suficientes para satisfazer as exigências metabólicas das larvas, se estes elementos forem realmente essenciais.

O tiosulfato não faz parte da composição iônica da água do mar (Tabela 1). De acordo com BOYD (1990) e NOGA (1996), a adição deste íon na água é o método mais efetivo para a remoção de resíduos de cloro (Cl_2). Como o tiosulfato de sódio não causou qualquer efeito tóxico às larvas, sugere-se que este deva ser adicionado na formulação, quando se utilizar água clorada (como a água de abastecimento público) no preparo da água artificial.

Os resultados observados neste trabalho sugerem que, na preparação de água para a larvicultura de *M. rosenbergii*, são dispensáveis os seguintes íons: Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} . SILVA (1995) obteve taxa de sobrevivência de pós-larvas de 47%, em um meio no qual não foi adicionado qualquer um desses elementos, corroborando esta hipótese. No entanto, segundo MALLASEN & VALENTI (submetido a publicação) a produtividade de pós-

larvas de *M. rosenbergii* foi menor em um meio artificial contendo 13 íons do que em água do mar natural. Esta maior produção pode ser explicada pela presença de outros íons não estudados neste trabalho ou substâncias orgânicas diluídas no meio natural. É importante ressaltar que estes íons aparentemente dispensáveis podem tornar-se essenciais em outros estágios ou ter um efeito retardado.

A água do tratamento 5 da Fase 5 preparada exclusivamente com sais macroelementos apresentou-se como um meio insuficiente para o desenvolvimento adequado das larvas (Tabela 13). SILVA (1995) também observou que a formulação composta, apenas, por elementos MA foi imprópria para a larvicultura de *M. rosenbergii*. Isto evidencia o caráter essencial do microelemento bromo junto aos macroelementos da água do mar artificial, para o desenvolvimento das larvas de *M. rosenbergii*.

O acréscimo de bicarbonato é usualmente necessário para manter a alcalinidade e o pH em níveis normais (SPOTTE, 1979; ESTEVES, 1988). BOWER et al. (1981) adicionaram NaHCO_3 à formulação da água do mar artificial, como substância tamponante, para manter o pH ligeiramente alcalino. A ausência do íon bicarbonato no tratamento 4 provocou uma diminuição do pH do meio (Tabela 16). WICKINS (1976) verificou que baixos valores de pH reduziram o crescimento em peneídeos, devido, provavelmente, à ação tóxica do dióxido de carbono. Geralmente, o efeito do pH sobre os organismos ocorre de forma indireta; segundo SPOTTE (1979) a redução do pH eleva as concentrações de CO_2 livre diminuindo a afinidade do pigmento

respiratório pelo oxigênio. No entanto, para SEBASTIAN (1990), a presença de bicarbonato é fundamental para as atividades fisiológicas do *M. rosenbergii*. O HCO_3^- , juntamente com o Ca^{2+} , participam do processo de calcificação do exoesqueletos de crustáceos decápodes (TAYLOR et al., 1991). Não se pode afirmar, com base nos resultados obtidos aqui, se a diminuição do tempo de vida das larvas ocorreu devido à ausência do íon HCO_3^- ou ao baixo pH da água gerado pela falta deste.

A carência de potássio e cálcio provocaram um elevado estresse às larvas ocasionando sua morte rápida. Isto indica que o meio é uma fonte importante destes elementos para as larvas de *M. rosenbergii* e estas apresentam mecanismos desenvolvidos para absorvê-los. Por outro lado, as reservas acumuladas durante a fase de ovo não foram suficientes para manter o metabolismo dos animais nesta fase inicial do desenvolvimento, sugerindo uma demanda crescente desses íons para as necessidades das larvas. O cálcio é um importante componente do exoesqueleto dos crustáceos e, portanto, ocorrerá um aumento na quantidade absoluta desse elemento no corpo das larvas com o crescimento.

Em salinidades variando de 0 a 28‰, adultos de *M. rosenbergii* mantiveram hiperregulados os íons K^+ e Ca^{2+} , e suas respectivas concentrações na hemolinfa foram de ,aproximadamente, 7,8 e 15 mmol/L (STERN et al., 1987; FUNGE - SMITH et al., 1995). Entre as principais funções do potássio está a troca e o transporte de outros íons para os meios intra e extracelulares; na célula, o cálcio tem vários papéis, sendo a manutenção das estruturas da membrana celular um dos mais

importantes (ESTEVEZ, 1988).

FUNGE - SMITH et al. (1995) verificaram que adultos de *M. rosenbergii* mantinham níveis de cálcio na hemolinfa relativamente estáveis. Esta concentração constante torna-se vantajosa devido à importância deste íon em muitos processos fisiológicos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o K^+ e o Ca^{2+} são os íons componentes da água salobra mais importantes para o desenvolvimento de larvas de *M. rosenbergii* no estágio II, seguidos pelo Br^- e HCO_3^- , respectivamente.

No entanto, não existem estudos indicando as concentrações iônicas mínimas necessárias que proporcione às larvas um ambiente apropriado para o seu desenvolvimento. Esta é uma área importante que deve ser pesquisada tanto para fins teóricos como práticos. Em uma condição de “conforto osmótico” o organismo poderia deslocar o gasto energético envolvido na regulação iônica para outras funções, como por exemplo, o crescimento e a aceleração do desenvolvimento larval. Outros trabalhos de pesquisa devem ser desenvolvidos, para verificar quais são as concentrações mínimas que o animal pode suportar sem estresse e como estes elementos agem sobre as larvas durante o processo ontogenético. A capacidade de regulação pode variar com os estágios e com o desenvolvimento.

Neste trabalho não foi fornecido alimento às larvas. No entanto, a literatura sugere que a alimentação pode ser uma importante fonte de elementos para a regulação iônica. Os resultados obtidos por MORRITT (1989) indicam que o sódio

pode ser absorvido do alimento no intestino de anfípodes e isto pode representar uma importante parte da regulação iônica. Para STERN et al. (1987) a manutenção hiperiônica do K^+ em adultos de *M. rosenbergii*, em todas as salinidades testadas (0, 15 e 24‰), pode ser atribuída à reabsorção deste íon nas glândulas antenais e à ingestão de alimentos. Segundo RAINBOW & WHITE (1990) os alimentos podem ser fornecedores de elementos traços para o desenvolvimento dos invertebrados marinhos. Portanto, os íons estudados aqui, possivelmente, podem ser obtidos pela alimentação e o animal pode não depender, exclusivamente, da absorção direta do meio.

O teste de inanição proposto por COOPER & HEINEN (1991) foi capaz de detectar o estresse causado pela carência de alguns íons na água e proporcionou resultados rápidos e confiáveis, sendo, portanto, adequado para estudos referentes a efeitos dos parâmetros do meio sobre as larvas.

A temperatura, salinidade e pH, de maneira geral, permaneceram dentro dos níveis recomendados para o desenvolvimento larval de *M. rosenbergii* (NEW,1990), com exceção do tratamento 4 da Fase 5, preparado sem o bicarbonato de sódio, que ocasionou uma diminuição do valor de pH. Assim sendo, estes parâmetros não devem ter ocasionado variação nos dados analisados.

6 . CONCLUSÕES

A partir do estudo dos diversos meios de água do mar artificial testados com larvas de *M. rosenbergii* no estágio II, pode-se concluir:

- os elementos traços: Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} e os microelementos: Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ não favoreceram o aumento do tempo de vida das larvas.

- a presença dos íons K^+ , Ca^{2+} , Br^- e HCO_3^- no meio é essencial para o desenvolvimento larval. A água é uma importante fonte desses elementos para as larvas, pelo menos até o estágio II, e estas devem ter mecanismos eficientes de absorção desses elementos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDWELL, J.P., SPOTTE, S. Artificial seawater: formulas and methods. Woods Hole: Jones & Bartlett, 1985. 349p.
- BOWER, C.E., TUNER, D. T., SPOTTE, S. pH maintenance in closed seawater culture systems: limitations of calcareous filtrants. Aquaculture, v.23, p.211-7, 1981.
- BOYD, C.E. Water quality in ponds of aquaculture. Alabama: Birmingham Publishing, 1990. 482p.
- BRANNON, A.C., RAO, R.K. Barium, strontium and calcium levels in the exoskeleton, hepatopancreas and abdominal muscle of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: relation to molting and exposure to barite. Comparative Biochemistry and Physiology, v.63A, p.261-74, 1979.
- COOPER, R.K., HEINEN, J.M. A starvation test to determine optimal salinities for larval freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology, v.100A, n.3, p.537-42, 1991.
- DEPLEDGE, M.H. Re-evaluation of metabolic requirements for copper and zinc in decapod crustaceans. Marine Environmental Research, v.27, p.115-26, 1989.
- ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1988. 575p.

- FOYN, E. The composition of seawater and the significance of the chemical components of marine environmental. In: RILEY, J.P., SKIRROW, G. Chemical oceanography. 2.ed. London: Academic Press, 1975. p.11-33.
- FUNGE-SMITH, S.J., et al. Osmotic and ionic regulation in the giant malaysian fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strontion and bromine. Comparative Biochemistry and Physiology, v.110A, n.4, p.357-65, 1995.
- GALTSOFF, P.S. General methods of collecting, mantaning and rearing marine invertebrates in laboratory. In: LUTS, F.E. et al. Culture methods for invertebrates animals. New York: Dover, 1937. p.5-50.
- GIBBS, P.E., BRYAN, G.W. A study of strontium, magnesium, and calcium in the environment and exoeskeleton of decapod crustaceans, with special reference to *Uca burgersi* on barbuda, west indies. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.9, p.97-110, 1972.
- GILLES, R., PEQUEUS, A. Interactions of chemical and osmotic regulation with the environmental. In: BLISS, D.E. The biology of crustacea. New-York: Academic Press, 1983. p.109-77.
- GOMEZ, D.G. Effect of environmental embryonic temperature on larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.114, p.39-47, 1987.
- GUZMÁN, E.S.C. Bioquímica de pescados e derivados. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409p.
- HANSEN, J.I., MUSTAFA, T., DEPLEDGE, M. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*. I. Effects on Na, K-ATPase activity, haemolymph electrolyte concentrations and tissue water contents. Marine Biology, v.114, n.2, p.253-7, 1992.

- KINNE, O. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. In: BARNES, H. Oceanography and marine biology: an annual review. London: George Allen and Unwim, 1964. p.281-339.
- KINNE, O. Cultivation of marine organisms: water-quality management and technology. In: Marine ecology. London: John Wiley and Sons, 1976. p.19-37.
- KRISHNAJA, A.P., REGE, M.S., JOSHI, A.G. Toxic effects of certain heavy metal (Hg, Cd, Pb, As and Se) on the intertidal crab *Scylla serrata*. Marine Environmental Research, v.21, n.2, p.109-19, 1987.
- LINDA, H.M., LINDA, L.F. Osmotic and ionic regulation. In: BLISS, D.E. The biology of crustacea. New-York: Academic Press, 1983. p.54-143.
- LING, S.W. Methods of rearing and culturing of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Glugor: Fisheries Research Institute, 1969. p. 607-19.(Mimeogr.).
- MALLASEN, M., VALENTI, W.C. Larviculture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) in closed system using a specific artificial brackish water. Journal World Aquaculture Society. (submetido a publicação).
- MANAHAN, D.J. Adaptations by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. American Zoologist, v.30, p.147-60, 1990.
- MANGUM, C.P. Oxygen transport in the blood. In: BLISS, D.E. The biology of crustacea. New-York: Academic Press, 1983. p.373-429.
- MORRIT, D. Ionic regulation in littoral and terrestrial amphipods (crustacea: amphipoda: talitridae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.32, n.1, p.53-67, 1989.
- MORRIT, D., SPICER, J.I. Mini review: a brief re-examination of the function and regulation of extracellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropods. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 106A, n.1, p.19-23, 1993.
- NAIR, C.M., HAMEED, M.S. Commercial production of scampi seed using synthetic brackish water. In: SILAS, E.G. Freshwater prawns. Trissur: Kelara Agricultural University, 1992. p.152-5.

- NEIHEISEL, T.W., YOUNG, M.E. Use of three artificial sea salts to maintain fertile sea urchins (*Arbacia punctulata*) and to conduct fertilization test with copper and sodium dodecyl sulfate. Environmental Toxicology and Chemistry, v.11, n.8, p.1179-85, 1992.
- NEW, M.B. Freshwater prawn culture: a review. Aquaculture, v.88, p.99-142, 1990.
- _____. Status of freshwater prawn farming: a review. Aquaculture Research, v.26, p.1-54, 1995.
- NOGA, E.J. Fish disease. St.Louis: Mosby, 1996. p.227.
- OPEM UNIVERSITY COURSE TEAM. Seawater: its composition, properties and behaviour. Oxford: Wheatons, 1989. p.30-39, 86-88, 104.
- RAINBOW, P.S. The significance of trace metal concentrations in decapods. In: SYMPOSIA OF THE ZOOLOGICAL SOCIETY OF LONDON, 1987, London. Proceedings...London: Clarendon Press, 1988. p.291-313.
- _____. Heavy metal levels in marine invertebrates. In: FURNESS, R.W., RAINBOW, P.S. Heavy metals in marine environment. Boca Raton: CRC Press, p.67-79. 1990.
- _____. The significance of accumulated heavy metal concentrations in marine organisms. In: BIOACCUMULATION WORKSHOP: Assessment Of The Distribution, Impacts And Bioaccumulation Of Contaminants In Aquatic Environments, 1992, Sydney. Proceedings...p.1-13.
- RAINBOW, P.S., WHITE, S.L. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustacean: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and barnacle. Hidrobiologia, v.174, n.3, p.245-62, 1989.
- _____. Comparative accumulation of cobalt by three crustacean: a decapod, an amphipod and a barnacle. Aquatic Toxicology, v.16, p.113-26, 1990.
- RAINBOW, P.S., MALIK, I., O'BRIEN, P. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. Aquatic Toxicology, v.25, p. 15-30, 1993.

- SARDÁ, F., CROS, M.L., SESÉ, B. Ca balance during moulting in prawn *Aristeus antennatus* (Risso, 1916): the role of cuticle calcification in the life cycle of decapod crustaceans. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.129, p.161-71, 1989.
- SEBASTIAN, M.T. The giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Trissur: Kelara Agricultural University, 1990. 47p.
- SILVA, C.A. Utilização de água do mar artificial em larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)[Crustacea, Palaemonidae]. Jaboticabal, 1995. 132p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- SIEBERS, D. et al. Conductive sodium entry in gill cells of the shore crab, *Carcinus maenas*. Marine Biology, v.101, n.1, p.61-8, 1989.
- SMITH, T.I.J., SANDIFER, P.A., TRIMBLE, W.C. Progress in developing a recirculating synthetic seawater hatchery for rearing larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. In: FEED-DRUGS FROM THE SEA, 1, 1976, Puerto Rico. Proceedings...p.166-80.
- SPOTTE, S. Fish and invertebrate culture: water management in closed systems. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 179p.
- SPOTTE, S., ADAMS, G., BUBUCIS, P.M. GP₂ medium is an artificial seawater for culture or maintenance of marine organisms. Zoo Biology, v.3, p.229-40, 1984.
- STERN, S., BORUT, A., COHEN, D. Osmotic and ionic regulation of the prawn of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) adapted to varying salinities and ion concentrations. Comparative Biochemistry and Physiology, v.86A, n.2, p.373-9, 1987.
- SVERDRUP, H.U., JOHNSON, M.W., FLEMING, R.H. The oceans, their physics, chemistry and general biology. New York: Prentice Hall, 1942. p. 174-87.
- TAYLOR, E.W., WHITELEY, N.M., WHEATLY, M.G. Respiratory gas exchange and the regulation of acid-base status in decapodan crustaceans. In: WOAKES, M.K.,

- GRIESHABER, C.R., BRIDGES, C.R. Physiological strategies for gas exchange and metabolism. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p.79-106.
- VALENTI, W.C. Estudo da viabilidade de utilização da água do mar artificial para larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Jaboticabal: FCAV, 1990. 51p. (Relatório FAPESP).
- _____. Freshwater prawn culture in Brazil. World Aquaculture, v.24, n.1, p.30-4, 1993a.
- _____. Seawater substitution in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) hatchery. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 4, CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 1, 1993b, João Pessoa. Resumos...p.73.
- WEBSTER, C.A., TIDWELL, J.H. Diets, feeding, and production of freshwater prawn in Kentucky. Aquaculture Magazine, v.21, n.6, p.47-60, 1995.
- WICKINS, J.F. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. Aquaculture, v.9, p.19-37, 1976.
- WILSON, T.R.S. Salinity elements in seawater. In: RILEY, J.P., SKIRROW, G. Chemical oceanography. 2.ed. London: Academic Press, 1975. p.367-409.
- ZATTA, P. Interaction between Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} with hemocyanin from *Carcinus maenas*. Cahiers de Biologie Marine, v.26, n.3, p.241-9, 1985.

ABSTRACT

“Effect of water ionic composition on the development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) at the larval stage II.”

The importance of the ions presence in water Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , Br^- , Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} on the development of *Macrobrachium rosenbergii* at the larval stage II was evaluated, in order to obtain information to optimize the ionic composition of the brackish water used to larviculture this species. Artificial sea water was prepared according to the formulation used by the Crustacean Rearing Laboratory of CAUNESP. In this formula, salts are classified in major elements, minor elements and trace elements. In this experiment, a starvation test was applied. It consisted in keeping larvae of *M. rosenbergii*, at the stage II, in 30 ml beakers containing 15 ml of brackish water (12‰). The beakers were kept at about 30°C of controlled air temperature. There were five phases conducted sequentially (phases 1 to 5). Brackish water of different ionic composition, in relation to the trace elements Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} , were evaluated on the first two phases. Different formulas containing the minor elements Br^- , Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ were evaluated on phases 3 and 4. And five media with different ionic composition containing the major elements Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , and the minor element Br^- , were evaluated on phase 5. Three beakers were used per treatment, and each was stocked with six larvae, in a complete randomized

experimental design. In order to estimate the average life time, the number of larvae that survived the treatment was counted every eight hours. The data were analyzed through ANOVA and the means were compared by the Tukey test. The trace elements Al^{3+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} and the minor elements Sr^{2+} , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} , Li^+ , MoO_4^{2-} and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ did not allow an increase of the larvae life time at the second larval stage. These ions could, however, become essential to this organism at the other stages, or could show a retardation effect. Sodium thiosulphate must be added to the artificial sea water formulation, when chlorinated water is used for salt dilution. Potassium and Ca^{2+} were the most important ions for larvae development, followed by Br^- and HCO_3^- , respectively.