

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Cláudio Kinach Loureiro

Produção de Ciliados e Nematódeos
para Utilização como Alimento Vivo para Camarões na Fase de
Berçário Cultivados em Meio à Bioflocos

Rio Grande, RS
2012

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Produção de Ciliados e Nematódeos
para Utilização como Alimento Vivo para Camarões na Fase de
Berçário Cultivados em Meio à Bioflocos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Dr. Paulo César Abreu
Co-Orientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr

Rio Grande, RS

2012

Ata de aprovação

Elaborada pela CCPPGAq, com assinatura de todos os membros da Banca Examinadora, do coordenador e do aluno

Ficha catalográfica

A cargo da CCPPGAq.

Índice

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS.....	16
<i>Objetivo Geral</i>	16
<i>Objetivos Específicos</i>	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	16
CAPÍTULO I - PRODUÇÃO MASSIVA DE CILIADOS E NEMATÓDEOS PARA UTILIZAÇÃO COMO ALIMENTO VIVO NA AQUICULTURA	21
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	26
<i>Local de estudo</i>	26
<i>Unidades Experimentais</i>	27
<i>Inóculo inicial</i>	27
<i>Meio para Cultivo de Ciliados e Nematódeos</i>	28
<i>Amostragem de Microorganismos e Análise da Concentração de Amônia</i>	28
<i>Obtenção dos microorganismos produzidos</i>	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II - UTILIZAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS, ROTÍFEROS E NEMATÓDEOS COMO ALIMENTO VIVO PARA CAMARÕES CULTIVADOS EM MEIO À BIOFLOCOS.....	43
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	45

MATERIAL E MÉTODOS	47
<i>Local de estudo.....</i>	47
<i>Meio para Cultivo de Protozoários e Nematódeos.....</i>	47
<i>Unidades experimentais.....</i>	48
<i>Delineamento experimental.....</i>	48
<i>Biofloco.....</i>	48
<i>Manutenção das unidades experimentais.....</i>	49
<i>Análise dos microorganismos.....</i>	49
<i>Parâmetros físico-químicos.....</i>	50
<i>Alimentação das pós-larvas.....</i>	50
<i>Análise do conteúdo estomacal dos camarões.....</i>	51
<i>Análise estatística.....</i>	51
RESULTADOS.....	51
ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	51
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	52
ANÁLISE DOS MICROORGANISMOS	53
ANÁLISE DO CONTEÚDO ESTOMACAL DOS CAMARÕES.....	57
DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO III – CULTIVO DE CAMARÕES <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> EM SISTEMA BFT	
ENRIQUECIDO COM NEMATÓDEOS <i>RHABDITIS SP.</i>.....	65
RESUMO	66
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	69

DESENHO EXPERIMENTAL	69
FORNECIMENTO DE RAÇÃO	69
BIOFLOCO	70
MEIO PARA CULTIVO DE PROTOZOÁRIOS E NEMATÓDEOS	70
NEMATÓDEOS	70
INÓCULO DE NEMATÓDEOS	71
ANÁLISE DOS MICROORGANISMOS	71
<i>Análise do conteúdo estomacal</i>	71
ANÁLISE DA QUALIDADE DE ÁGUA	72
<i>Oxigênio dissolvido, Amônia – NAT, Temperatura e pH</i>	72
SÓLIDOS SEDIMENTÁVEIS	72
ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
RESULTADOS	73
DISCUSSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
DISCUSSÃO GERAL	89
CONCLUSÃO GERAL	90
PERSPECTIVAS DE FUTUROS ESTUDOS	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISCUSSÃO GERAL	91

Dedicatória

Para meus queridos pais Plínio Filho e Claudete

Agradecimentos

Ao professor Paulo César Abreu pelas orientações científica, ética e muitas vezes pessoal durante estes anos em que trabalhamos juntos, muito obrigado.

Agradeço ao professor Wilson Wasielesky Jr. pelas valiosas sugestões durante o desenvolvimento desta tese.

Às professoras Clarisse Odebrecht e Virgínia Garcia pelos ensinamentos durante os 6 anos de convivência no Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos (FURG), muito obrigado.

Meus agradecimentos aos amigos Sérgio Pilenghi e Getúlio da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, pela atenção bem humorada, prestada nos momentos em que eu os procurava com algum “probleminha” para ser resolvido.

Meus sinceros agradecimentos aos inesquecíveis “amigos do sul”, pelos momentos vividos e que fizeram meus dias mais felizes durante todos esses anos vividos na Praia do Cassino: Carlos Fujita, Márcio Silva de Souza (Cabeção), Scooby, Kássio Rios da Silva, Igor (Pará), William Dresh, Rodrigo da Rosa Silveira, Rodrigo Cerqueira Fernandes, Fábio Roselet, Iuri Abou Ani, Lucélia Borges, Erica, Alessandra Arriada, Lise Maria, Hn Haigh They, Marcondes Gonzaga Jr. e Rodrigo Randow, muito obrigado.

Aos amigos da Estação Marinha de Aquicultura: Renatão, Ricardo, Okamoto, Janaína, Shei, Paulinha, Bárbara, Fabi, Camú, Willian, Angélica, Geraldão, Anderson (motóra), Eduardo Ballester (agora professor da UFPR) e Charles muito obrigado pela companhia.

Aos meus queridos pais Plínio Marcondes Loureiro Filho e Claudete Kinach Loureiro pelo apoio incondicional em todas as horas, muito obrigado.

Ao meu irmão Plínio Neto e minha cunhada Titi pela valiosa ajuda prestada nos momentos em que precisei, muito obrigado.

Agradeço ao José Carvalho pelas ajudas sempre que precisei, obrigado pela sua

amizade.

À incrível Graziela Medaglia por estar sempre ao meu lado durante esta longa caminhada, me apoiando com carinho e um belo sorriso sempre, mesmo que na maioria do tempo à distância, muito obrigado.

Agradeço ao Projeto REUNI por viabilizar a realização deste projeto pessoal;

Em fim, a todos que me ajudaram de alguma forma na execução destes trabalhos e não estão presentes nesta lista, muito obrigado.

Resumo

Um Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos - MCCN foi desenvolvido para produzir massivamente comunidades de flagelados, ciliados e nematódeos de forma econômica, para sua posterior utilização como alimento vivo.

Após o desenvolvimento desta metodologia de produção, (Capítulo 1) foram realizados dois experimentos onde ciliados (Capítulo 2) e nematódeos (Capítulo 3) produzidos foram oferecidos a larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (PL 8) nas fases inicial, intermediária e final de cultivo. Os primeiros resultados obtidos utilizando o MCCN como fonte de alimento vivo mostraram que a preferência alimentar das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* variou de acordo com a fase de seu desenvolvimento. Na fase inicial de cultivo, as pós-larvas capturaram preferencialmente ciliados e rotíferos, já os nematódeos foram efetivamente predados nas 3 fases analisadas.

O peso final dos camarões cultivados no sistema BFT (“Biofloc Technology”) enriquecido com nematódeos foi significativamente maior do que o obtido pelos camarões cultivados no tratamento controle BF, indicando o grande potencial destes organismos para o aumento da produtividade dos cultivos super-intensivos de camarões marinhos.

Abstract

The Ciliate and Nematodes Culture Medium - CNCM, was designed to produce massive communities of flagellates, ciliates and nematodes in an economical way for their subsequent use of these organisms as live food.

After the production of these organisms (Chapter 1), two experiments were carried out in which ciliates (Chapter 2) and nematodes (Chapter 3) produced were offered to larvae of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the initial, intermediate and final phase of culture. The first results obtained using the CNCM as a source of live food showed that the preference of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* varied according to its development phase. In the initial stages, the post-larvae captured preferentially ciliates and rotifers, however nematodes have been preyed effectively at the three phases of culture.

The promising results obtained in relation to the final weight and survival of cultured shrimp in the system (BFT "Biofloc Technology") enriched with ciliates and nematodes indicate the great potential of the Protozoan and Nematodes Culture Method to increase the productivity of marine shrimp ponds.

Introdução Geral

O fitoplâncton representa a base alimentar em ambientes marinhos, sendo indispensáveis nos cultivos comerciais de várias espécies marinhas, como fonte de alimento em todos os estágios de desenvolvimento de moluscos bivalves, estágios larvais de algumas espécies de crustáceos e peixes (Coutteau 1996).

Entre as dietas vivas utilizadas na aquicultura os rotíferos são conhecidos pelo sucesso como alimento vivo na aquicultura, devido seu tamanho reduzido e pela velocidade de nado, tornando-os uma presa adequada para organismos cultivados recém eclodidos (Dhert 1996). Já os nauplios de *Artemia* são amplamente utilizados, principalmente pela habilidade deste pequeno crustáceo em formar embriões dormentes, chamados de cistos, que explica sua designação como excelente alimento vivo para larvas (Van Stappen, 1996). Igualmente às microalgas, rotíferos e *Artemia* os ciliados (Stoecker & Capuzzo 1990) e nematódeos são importantes presas para larvas de peixes (Sautter *et al.* 2007) e crustáceos (Biedenbach *et al.* 1989; Focken *et al.* 2006).

Nos últimos anos algumas espécies de copépodos têm sido empregadas como alimento para larvas de peixes e camarões (Schipp *et al.* 1999, Payne *et al.* 2001, McKinnon *et al.* 2003). Para manter alta biomassa de copépodos como o Calanoida *Acartia tonsa*, Maeda (2002) indica o uso de ciliados a uma concentração de 1.10^3 cels/L. Da mesma forma, para aumentar a produção de ovos do copépodo *Scottolana canadensis*, utilizou-se ciliados como alimento, possibilitando reduzir o uso de microalgas.

A utilização de microorganismos na aquicultura tem sido apontada como uma maneira de se estabelecer sistemas de cultivo mais produtivos e com menor impacto ambiental (Moriarty 1987, 1997; Maeda 2002). Sistemas intensivos de produção de camarões marinhos dependem de uma saudável e diversificada comunidade microbiana para incrementar o crescimento, sobrevivência e manter a qualidade de água em condições adequadas (Thompson *et al.* 1999, Moss 2002, Wasielesky *et al.* 2006).

O uso de microorganismos na aquicultura deve se basear em conceitos ecológicos que permitam a melhor compreensão e manuseio dos fluxos de matéria e energia nos sistemas de cultivo. Neste sentido, Pomeroy (1974) e Azam *et al.* (1983) documentaram a importância dos microorganismos na transferência de matéria e energia, através da cadeia alimentar microbiana em ambientes oceânicos. Novos conceitos propostos por estes autores mostraram que a fração dissolvida da matéria orgânica torna-se disponível aos níveis tróficos superiores das cadeias alimentares, através de sua absorção pelas bactérias e o consumo destas, pelos organismos do protozooplâncton. Estas interações tróficas entre microorganismos recebeu a denominação de Alça Microbiana, ou “Microbial loop” (Azam *et al.* 2002). Da mesma forma que na natureza, os microorganismos são encontrados em grande número em ambientes de cultivo e são presas naturais de larvas de moluscos, crustáceos e peixes (Horowitz & Horowitz 2002).

De acordo com Stolp (1988) a matéria seca de microorganismos eucariontes é composta por 50% de proteínas, 10% de lipídeos, 10-20% de RNA e 3-4% de DNA. Já as bactérias são pobres em ácidos graxos de cadeia

longa (PUFA), porém são importante fonte de outros nutrientes essenciais específicos como vitaminas do complexo B.

Estudos realizados por Tacon *et al.* (2002) apontaram que dietas formuladas para camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistemas sem renovação de água, não necessitam de suplementação com vitaminas e minerais, devido a habilidade dos camarões em obter nutrientes adicionais, capturando microrganismos produzidos no próprio sistema, conhecido como Biofloc Technology System, ou sistema BFT. Segundo Hargreaves (2006) o princípio básico do sistema BFT, se baseia na retenção dos resíduos sólidos nos viveiros de cultivo, mantendo-os em suspensão. A conversão deste material orgânico em flocos bacterianos se dá em decorrência da aeração vigorosa da coluna de água, além da adição de fontes de carbono, que induzem a multiplicação das bactérias aeróbicas heterotróficas responsáveis pela decomposição da matéria orgânica (Hargreaves 2006; Avnimelech 2009).

Como informado acima, as bactérias servem de alimento para os protozoários que além de possuírem tamanho adequado para consumo pelas larvas de organismos cultivados, apresentam também importante qualidade nutricional (Phillips 1984; Horowitz & Horowitz 2002). Além disto, os microorganismos podem servir de alimento para pequenos animais que, por sua vez, são utilizados para alimentar os organismos alvo na aquicultura. Estudos indicaram que microorganismos podem alimentar o copépodo Calanoida *Acartia tonsa*, que é utilizado como alimento vivo em larviculturas de peixes e crustáceos (Atkinson 1996; Moriarty 1997; Zhucova & Kharlamenko, 1999; Maeda, 2002).

A forma de alimentação e os aparatos alimentares dos organismos cultivados na aquicultura, variam de acordo com a espécie e sua fase de desenvolvimento. Desta forma, torna-se necessário disponibilizar alimento vivo com diferentes classes de tamanho no decorrer do cultivo buscando melhorar o índice de sobrevivência das larvas cultivadas (Stoecker & Capuzzo 1990; Fernandez-Diaz *et al.* 1994; Genodepa *et al.* 2004; Dunphy *et al.* 2006).

Para Umesh *et al.* (1999) substratos biodegradáveis como bagaço de cana-de-açúcar possuem grande potencial para a colonização microbiana quando comparados com substratos menos degradáveis, como bambu ou plásticos. Alguns autores recomendam substratos vegetais como farelo de trigo e alfafa, entre outros, para serem utilizados na colonização por microrganismos, com o objetivo de enriquecer as dietas dos organismos cultivados (Umesh *et al.* 1999; Ramesh *et al.* 1999).

Martinez-Córdova (2002) afirma que a utilização de um composto utilizando feno de alfafa, associado às leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em viveiros de cultivo semi-intensivo de camarões, torna possível manter a comunidade zooplanctônica mais abundante durante o ciclo de cultivo de camarões.

Loureiro (2006) observou o desenvolvimento de comunidades de microrganismos em meios de cultivo experimentais, utilizando como substratos biodegradáveis a alfafa, casca de soja e o bagaço de cana-de-açúcar associados às leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Neste estudo a alfafa proporcionou maior biomassa de bactérias livres e aderidas; o maior número de bactérias gerou um aumento na abundância de flagelados e nematódeos.

Em decorrência do potencial da alfafa para o desenvolvimento de uma cadeia alimentar microbiana e a possibilidade da utilização destes organismos como alimento vivo, foram realizados experimentos para estabelecer um protocolo de produção massiva de microorganismos utilizando insumos de baixo custo. Desta forma, a técnica de Martinez-Córdova (2002) foi adaptada para a produção massiva de ciliados e nematódeos em um procedimento preliminar chamado de “Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos - MCCN”.

Através do MCCN é possível produzir massivamente ciliados e nematódeos utilizando ingredientes de baixo custo, para enriquecer o floco microbiano em tanques berçário do camarão *Litopenaeus vannamei*, contribuindo para o maior ganho de peso dos camarões ao final do cultivo. Entretanto, este meio precisa ser aprimorado no que se refere à sua composição e procedimentos de cultivo.

Para tornar possível a utilização dos ciliados e nematódeos produzidos pelo MCCN como alimento vivo, uma série de testes preliminares foram realizados objetivando: A) determinar a relação entre os ingredientes que compõe o MCCN que aliasse produtividade e facilidade de manejo B) determinar a temperatura mais adequada para a maximizar a produtividade de ciliados e nematódeos no MCCN e C) minimizar a geração de metabólitos tóxicos para os organismos cultivados como por exemplo os compostos nitrogenados.

No Capítulo 1 da Tese são apresentados os detalhes do Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos. Posteriormente, no Capítulo 2 e 3 são apresentados os resultados de estudos onde, ciliados e nematódeos

produzidos através do MCCN, foram adicionados ao biofloco para o cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei* na fase de berçário.

Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolvimento de um meio de cultivo de ciliados e nematódeos para utilização destes organismos como elementos enriquecedores do floco microbiano, utilizando ingredientes de baixo custo e contribuindo desta maneira, para o maior crescimento do camarão cultivado em meio à bioflocos.

Objetivos Específicos

- Estabelecer o protocolo de produção massiva de ciliados e nematódeos utilizando ingredientes de baixo custo.
- Avaliar o efeito da complementação do biofloco com ciliados produzidos pelo Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos, na sobrevivência e peso final dos camarões *Litopenaeus vannamei*.
- Avaliar o efeito da complementação do floco microbiano com nematódeos produzidos pelo Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos, na sobrevivência e peso final dos camarões *L. vannamei*.

Referências Bibliográficas da Introdução Geral

Atkinson, A. (1996) Subantarctic copepods in an oceanic, low chlorophyll environment: Ciliate predation, food selectivity and impact on prey populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **130**, p. 85-96.

Avnimelech, Y. (2009) Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World

Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

- Azam, F., Haskell, S. & Forest, R. (2002) The Microbial Loop in Aquaculture. In: LEE, C-S & O'BRYEN (eds) *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*. Baton Rouge, The World Aquaculture Society, 87-97.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. & Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, p. 257-263.
- Biedenbach, J. M., Smith, L. L., Thomsen, T. K. & Lawrence, A. L. (1989) Use of the Nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *J. World Aquac. Soc.*, **20**, 61-71.
- Coutteau, P. (1996) Micro-Algae, In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (Lavens, P. & Sorgeloos, P. eds.), pp. 7-48. FAO Fish. Tech. Pap., Rome.
- Dhert, P. (1996) Rotifers, In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (Lavens, P. & Sorgeloos, P. eds.), pp. 49-78. FAO Fish. Tech. Pap., Rome.
- Dunphy, B. J., Hall, Jeffs, J. A. & Wells, R. M. G. (2006) Selective particle feeding by the Chilean oyster, *Ostrea chilensis*; implications for nursery culture and broodstock conditioning. *Aquaculture*, **261**, p. 594-602.
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. & Yufera, M. (1994) Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.*, **118**, p. 323-328.

- Focken, U, Schlechtriem, C., Garc, A., Puello-Cruz, A. & Becker, K. (2006) *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquac. Res.*, **37**, p.1429-1436.
- Genodepa, J., Southgate, P. C. & Zeng, C. (2004) Diet particle size preference and optimal ration for mud crab, *Scilla serrata*, larvae fed microbound diets. *Aquaculture*, **230**, p. 493-505.
- Hargreaves, J. A. (2006) Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.*, **34**, p. 344-363.
- Horowitz, S. & Horowitz, A. (2002) Microbial intervention in aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C.S. & O'Brian, P. eds.), pp. 119-131. Word Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Loureiro, C. K. (2006) *Sucessão microbiana na degradação de substratos orgânicos associados às leveduras (Sacharomyces cerevisiae): Potencial para utilização na Aqüicultura?* Tese de mestrado, 39 p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Maeda, M. (2002) Microbial communities and their use in aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C. S. & O'Brian, P. eds.), pp. 61-78. Word Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Martinez-Cordova, L. R. (2002) *Camaronicultura, avances y tendencias.* México, AGT Editor S.A. 167p.
- McKinnon, A. D. Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G. & Robino, B. (2003) The potential of paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, **223**, 89-106.

- Moriarty, D. J. W. (1987) Microbial Ecology in Aquaculture. In: *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture* (Moriarty, D. J. W. & Pullin, R. S. V. eds.), pp. 1-4. Proceedings of the Conference on Detrital Systems for Aquaculture, Italy.
- Moriarty, D. J. W. (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, **151**, p. 333-349.
- Moss, M. S. (2002) Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C. S. & O'Brian, P. eds.), pp. 01-18. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A.
- Payne, M. F., Rippingale, R. J., Cleary, J. J. (2001) Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, **194** (1), p. 137-150.
- Phillips, N. W. (1984) Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. *B. Mar. Sci.*, **35**, p. 283-298.
- Pomeroy, L. R. (1974) The Ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, **24**, p. 499-504.
- Ramesh, M. R., Shankar, K. M., Mohan, C. V. & Varghese, T. J. (1999) Comparison of three plant substrates for enhancing carp growth through bacterial biofilm. *Aquacult. Eng.*, **19**, p. 119-131.
- Schipp, G. R., Bosmans, J. M. P., Marshall, A. J. (1999) A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, **174**, 1-2, p.

81-88.

Stoecker, D. K. & Capuzzo, J. M. (1990) Predation on protozoa: its importance to zooplâncton. *J. Plankton Res.*, **12**, p. 891-908.

Stolp, H. (1988) Microbial ecology: organisms, habitats, activities. Cambridge University Press 308p.

Tacon, A. G. J., Cody, L. D., Conquest, J. J., Divakaran, S., Forster, I. P. & Decamp, O. E. (2002) Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac. Nut.*, **8**, p.121-137.

Thompson, F. L., Abreu, P. C. & Cavalli, R. (1999) The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, **174**, p.139-153.

Umesh, N. R., Shankar, K. M. & Mohan, C. V. (1999) Enhancing growth of common carp, rohu and Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm. *Aquacult Int.*, **7**, p. 251–260.

Van Stappen, G. (1996) Artemia, In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (Lavens, P. & Sorgeloos, P. eds.), pp. 79-250. FAO *Fish. Tech. Pap., Rome*.

Wasielesky, W, Emerenciano, M., Ballester, M., Soares, R., Cavalli, R. & Abreu, P. C. (2006) Flocos Microbianos: um novo caminho a ser percorrido. *Revista Panorama da Aqüicultura*, **96**, p. 14-23.

Zhukova, N. & Kharlamenko, V. (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat. Microb. Ecol.*, **17**, p. 153-157.

**Capítulo I - Produção Massiva de Protozoários e Nematódeos
para Utilização como Alimento Vivo na Aquicultura**

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO, WILSON WASIELESKY JR, PAULO CÉSAR
ABREU

Produção Massiva de Protozoários e Nematódeos para uso como Alimento Vivo na Aquicultura

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO¹, WILSON WASIELESKY JR², PAULO CÉSAR ABREU²

1 – Curso de Pós-Graduação em Aquicultura – Universidade Federal do Rio Grande – FURG - +55 53 3233 6509 – C.P.: 474 - CEP: 96201-900 Rio Grande - RS - Brasil.

2 – Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

e-mail: ckloureiro@hotmail.com

Abstract

The microorganisms in aquaculture systems are natural preys for reared organisms, have a size spectrum suitable for the consumption of fish and crustacean larvae also have a good nutritional quality. The Ciliate and Nematode Cultivation Medium – CNCM, was intended to produce massive amount of flagellates, ciliates and nematodes to be used as live food. The medium is based on alfalfa, molasses, *Saccharomyces cerevisiae*, fish oil and ascorbic acid kept under controlled temperature (38°C) and aeration. High abundances of flagellates (range 14 µm), ciliates (range 20 – 80 µm) and nematodes (range 200 - 1000 µm) were obtained after the consumption of bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. The protozoan succession was marked by the emergence of flagellates (Bodoniidae) followed by the ciliates *Uronema* sp., and *Euplotes* sp. The nematode *Rhabditis* sp. appeared in the CNCM 10 days after the beginning of the culture. One potential problem in the CNCM is the high total ammonia concentration at the end of the study (69.35 mg L⁻¹). However, this problem can be surpassed with the drainage of CNCM with nets of different mesh sizes and dilution of concentrated protozoan and nematodes. The CNCM seems to be an effective method to produce live food of different size class in an unexpensive way.

Key words: Microorganism massive production; Flagellate; Ciliate, Alfalfa; Sugarcane molasses; *Saccharomyces cerevisiae*

Introdução

A necessidade de se produzir alimento para consumo humano, proporciona um incentivo para o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de cultivo na aqüicultura, visando não só expandir a quantidade produzida, mas também buscando proporcionar o aproveitamento racional dos recursos naturais (Gomes 2000).

A utilização de microorganismos tem sido apontada como uma maneira de se estabelecer sistemas de cultivo mais produtivos e com menor impacto ambiental (Moriarty 1987, 1997, Maeda 2002). Moss (2002) afirma que sistemas intensivos de produção de camarões marinhos dependem de uma saudável e diversificada comunidade microbiana para incrementar o crescimento, sobrevivência e manter aceitável a qualidade de água.

Os organismos cultivados na aqüicultura como crustáceos, peixes e moluscos, possuem distintos aparatos destinados a alimentação exigindo, portanto, alimentos de diversos tamanhos ao longo de sua produção (Berggreen *et al.* 1988; Stoecker & Capuzzo 1990; Fernandez-Diaz *et al.* 1994; Genodepa *et al.* 2004; Dunphy *et al.* 2006). Sabe-se que os microorganismos encontrados em viveiros de cultivo são presas naturais para os organismos cultivados (Horowitz & Horowitz 2002) complementando a alimentação em sistemas intensivos e permitindo a redução do valor protéico das rações, considerando o valor nutricional destes microorganismos.

De acordo com Stolp (1988) a matéria seca de microorganismos eucariontes é composta por 50% de proteínas, 10% de lipídeos, 10-20% de RNA e 3-4% de DNA. Já as bactérias são pobres em ácidos graxos de cadeia

longa (PUFA), porém são importante fonte de outros nutrientes essenciais específicos como vitaminas do complexo B. Estes microorganismos servem de alimento para os protozoários que, além de possuírem tamanho adequado para consumo por larvas de organismos cultivados, apresentam também importante qualidade nutricional. Os microorganismos eucarióticos (protozoários), por exemplo, contém esteróis e grande parcela destes são convertidas em colesterol ou em outras formas características de lipídeos (Phillips 1984; Horowitz & Horowitz 2002; Zhukova & Kharlamenko 1999).

Da mesma forma, os microorganismos tem sido utilizados como alimento para o copépodo Calanoida *Acartia tonsa*, utilizado como alimento vivo em muitas larviculturas (Moriarty 1997; Zhucova & Kharlamenko, 1999; Maeda, 2002; Treece 2002), mas normalmente empregado em larviculturas de peixes e crustáceos (Payne *et al.* 2001; McKinnon *et al.* 2003). De acordo com Maeda (2002) é possível manter a produção de *A. tonsa* alimentando-os com ciliados e a produção de ovos do copepodo *Scottolana canadensis* também aumenta quando alimentado com estes protozoários.

A *Artemia* e rotíferos são amplamente utilizados como alimento vivo na aquicultura, especialmente em larviculturas de muitas espécies de peixes e crustáceos (Watanabe *et al.* 1983; Haché & Plante 2011). As espécies de rotíferos de maior interesse para a aquicultura são *Brachionus plicatilis* e *B. rotundiformis*, medindo de 130-340 μm e 100-210 μm de comprimento, respectivamente (Hagiwara *et al.* 2001), enquanto o náuplio de *Artemia* sp. pode mede de 400 à 500 μm (Van Stappen 1996). Apesar de possuir elevado preço comercial, foi observado que náuplios de *Artemia* adicionados aos

tanques, podem ser vetores para organismos patogênicos (Thompson *et al.* 1999).

Em ambientes aquáticos, com o acúmulo de moléculas orgânicas em qualquer superfície submersa, inicia a formação do biofilme e sua colonização por microorganismos representados pelas bactérias, flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos. Estes microorganismos mostraram ser importante alternativa para cultivos intensivos do camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*, auxiliando na manutenção da qualidade de água, além de servir como fonte de alimento suplementar para as larvas (Thompson *et al.* 2002; Silva *et al.* 2008, Ballester *et al.* 2010).

Entre os substratos biodegradáveis, o bagaço de cana-de-açúcar tem maior potencial para colonização por microorganismos que outros, como bambu ou plásticos, menos degradáveis (Umesh *et al.* 1999). Entretanto, outros estudos confirmaram a efetividade do farelo de trigo, alfafa e outros materiais orgânicos utilizados como substrato para microorganismos, enriquecendo a dieta de organismos cultivados (Umesh *et al.* 1999; Ramesh *et al.* 1999, Ballester *et al.* 2010).

Martinez-Cordova *et al.* (2002) reportaram que, ao utilizar feno de alfafa associado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em viveiros de cultivo semi-intensivo de camarões, houve significativo aumento na biomassa de alguns organismos zooplanctônicos durante o ciclo de cultivo. Além disso, dados relacionados à produtividade de microorganismos em diferentes substratos como: feno de alfafa, casca de soja e bagaço de cana-de-açúcar associados à leveduras *S. cerevisiae*, demonstraram a maior efetividade da

alfafa para estimular grande biomassa de bactérias livres e aderidas. A maior abundância de bactérias repercutiu no incremento de flagelados e nematodeos no sistema (Loureiro 2006).

Estas informações indicam que a produção massiva de microrganismos com diferentes classes de tamanho é possível, o que poderá reduzir a dependência de alimentos vivos caros e muitas vezes difíceis de se obter, como é o caso da *Artemia*, rotíferos e copépodos.

Neste estudo foi proposto um método de produção massiva de flagelados, ciliados e nematódeos utilizando feno de alfafa associado à outros componentes. Esta técnica é designada como: Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos - MCCN.

Os dados apresentados neste trabalho mostram os resultados obtidos em uma investigação onde foi testada a produtividade do MCCN utilizando diferentes relações entre os ingredientes, bem como, diferentes condições de temperatura e salinidade do cultivo, objetivando aliar produtividade, facilidade de manejo e a redução dos metabólitos tóxicos como amônia – NAT gerados pelos processos de maturação do MCCN.

Material e métodos

Local de estudo

O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura - EMA/FURG na Praia do Cassino – Rio Grande – RS, iniciando no dia 27 de maio de 2010 e durou 24 dias.

Unidades Experimentais

Foram utilizados 5 tanques de fibra de vidro com capacidade para 50 litros cada, adaptados com sistema de aeração e aquecedores para manter a temperatura da água próxima à 38°C. A água marinha utilizada (salinidade 35) foi filtrada em filtro de areia e posteriormente por filtros cartucho (5µm) Cuno®.

Inóculo inicial

A metodologia de Martinez-Cordova (2002) foi utilizada para a formação de um banco de microorganismos que posteriormente foram inoculados no MCCN. Um inóculo de água estuarina foi adicionada à formulação de infusório para induzir o aparecimento de microorganismos de ocorrência natural no estuário da região onde o estudo foi realizado.

Para prevenir a introdução de organismos tóxicos para os organismos cultivados aos meios de cultivos, amostras de água estuarina foram coletadas, fixadas com solução de Lugol 2% e analisadas em câmaras de sedimentação (v:v) com volume de 2,1 mL (Thronsen 1978).

Em dois tanques de fibra de vidro foram adicionados 50 litros de água marinha filtrada com salinidade de 33, 2,5 litros de água estuarina (fonte de microorganismos) coletada na Lagoa dos Patos (sul do Brasil) e previamente aclimatada às condições de salinidade, 30 Kg de feno de alfafa, 300 gr de *Saccharomyces cerevisiae*, 750 mL de óleo de pescado, 3 Kg de melão de cana-de-açúcar e 25 g de vitamina C. Todos os ingredientes foram mantidos sob aeração e temperatura de 38° C durante os 10 dias que antecederam o início do experimento, passado este período, o MCCN foi inoculado.

Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos - MCCN

Para a formação do MCCN os seguintes componentes foram adicionados à 50 litros de água marinha filtrada: 50 mL L⁻¹ de inóculo inicial de microorganismos (descrito anteriormente), 50 mL L⁻¹ de melão de cana-de-açúcar e 3 g L⁻¹ de *S. cerevisiae*. As quantidades descritas para levedura e melão foram divididas em 2 aplicações com intervalos de 48 horas. Na segunda aplicação também foram adicionados: 300 g L⁻¹ de feno de alfafa, 0,2 g L⁻¹ de vitamina C e 4 mL L⁻¹ óleo de pescado.

Os 3 tanques contendo o MCCN permaneceram sob aeração durante 3 dias. A partir este dia, a aeração foi diminuída gradativamente para facilitar a precipitação do material mais pesado proveniente do feno de alfafa como torrões de terra, insetos mortos e outras impurezas. Este material permaneceu concentrado no fundo do tanque cilindro-cônico e posteriormente foi descartado.

Na fase inicial de cultivo a água apresentou-se bastante turva em consequência da adição dos ingredientes. Passados aproximadamente 10 dias, a água do MCCN encontrava-se translúcida e colonizada por diferentes grupos de microorganismos.

Amostragem de Microorganismos e Análise da Concentração de Amônia

Para o acompanhamento da sucessão dos protozoários e nematódeos no MCCN durante um ciclo de cultivo de 24 dias, as amostras de água foram coletadas a cada 48 horas. Solução de Lugol 2% (v:v) foi utilizada para a fixação do material que foi estocado em frascos âmbar (50 mL) para posterior análise. Alíquotas de 2,1 mL de cada amostra foram analisadas em câmaras de

sedimentação (Thronsen 1978).

Para a quantificação, os microorganismos foram categorizados em diferentes faixas de tamanho (Sieburth 1978). A classe dos nematódeos medindo de 200 à 1000 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 100X, os ciliados medindo de 20 à 80 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 200X e os flagelados medindo até 14 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 400X (Utermöhl 1958) utilizando um microscópio invertido Axiovert 135 (ZEISS). Para garantir a contagem mínima de 100 células/indivíduos, foram contadas 3 faixas para cada classe de tamanho de microorganismos.

Para a determinação da concentração da amônia total - NAT (UNESCO 1983), a cada 5 dias as amostras coletadas passavam por filtros com tamanho de malha de 50 μm e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Química da Estação Marinha de Aquicultura.

Separação dos microorganismos produzidos

Para coletar os diferentes microorganismos produzidos no MCCN, foi construído um conjunto de filtros de nylon com tamanho de malha variando de 30 à 1000 μm . Estes filtros também foram utilizados para drenar a água rica em compostos nitrogenados.

Inicialmente a água passava por filtros com tamanho de malha de 1000 e 500 μm para separar as partículas maiores. Os nematódeos foram retidos nos filtros com tamanho de malha de 300, 200 e 150 μm , enquanto os ciliados e flagelados foram concentrados nos filtros com tamanho de malha variando de 100, 85, 65, 50, 40 e 30 μm . Os organismos concentrados nestes filtros eram

posteriormente ressuspensos em água marinha previamente filtrada e prontos para serem quantificados e utilizados como alimento vivo.

Resultados e Discussão

A sucessão dos protozoários no MCCN foi marcada inicialmente pelo surgimento de flagelados (Bodonidae) com tamanho aproximado de 14 μm e a breve aparição do ciliado *Uronema* sp. (ca. 20 μm) (Fig. 1). Este ciliado permaneceu no cultivo durante os primeiros 4-6 dias de cultivo. Após, um segundo grupo de ciliados foi observado, *Euplotes* sp. medindo entre 30 e 80 μm . O nematódeo *Rhabditis* sp., medindo entre 200 e 1000 μm de comprimento, foi primeiramente quantificado no MCCN após 10 dias após o início do cultivo e permaneceu em alta concentração até o final do experimento (Fig. 1).

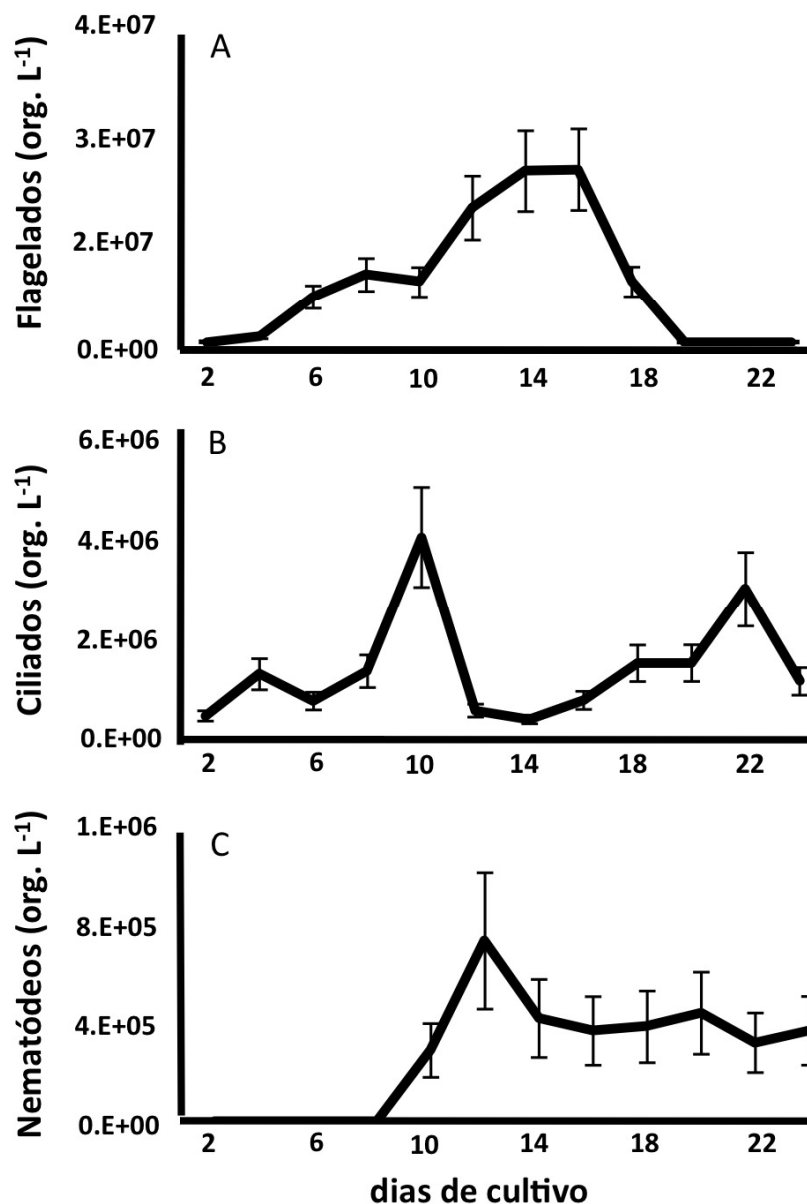


Figura 1: Abundância de microorganismos (MD \pm DP) no Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos durante 24 dias de cultivo. A) flagelados, B) ciliados e C) nematódeos.

A maior abundância de flagelados (Fig. 1A) foi registrado no dia décimo sexto dia de cultivo ($2,58 \times 10^7 \pm 6,29 \times 10^6$ células L⁻¹). O primeiro pico de crescimento de ciliados no décimo dia de cultivo ($4 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$ células L⁻¹) foi seguido por acentuado declínio na sua abundância ($3,41 \times 10^5 \pm 1,13 \times 10^5$ células L⁻¹) no décimo quarto dia de cultivo (Fig. 1B). Este declínio foi

provavelmente causado pela competição com os nematódeos por alimento (Ruppert *et al.* 2005, Warwick, 1987, Delbare & Dhert, 1996), cujo grupo aumentou após o décimo segundo dia de cultivo ($7,45 \times 10^5 \pm 4,05 \times 10^5$ células L⁻¹).

A redução na abundância dos ciliados refletiu diretamente sobre os flagelados, que aumentaram sua população até o décimo sexto dia. Entretanto, o segundo aumento na abundância de ciliados ($2,96 \times 10^6 \pm 9,17 \times 10^5$ células L⁻¹), composto principalmente por *Euplotes* sp., exerceu forte pressão de predação sobre os flagelados, que foram totalmente dizimados a partir do décimo sexto dia de cultivo. Este fato indica que ciliados atuaram como agente controlador sobre o grupo dos flagelados no MCCN, como observado por outros pesquisadores (Sherr & Sherr 2002).

Decamp *et al.* (2003) observaram que em viveiros de cultivo de camarões sem renovação de água, a concentração média de ciliados é de 1,17 e $1,51 \times 10^6$ células L⁻¹. Considerando a abundância de ciliados alcançada no MCCN, seria necessária a adição de 350 mL de MCCN em 1 litro de água filtrada para alcançar abundância similar de ciliados, porém estudos futuros poderão proporcionar o aumento da produtividade de ciliados do MCCN e diminuir este volume. De acordo com Zhukova & Kharlamenko (1999), os flagelados e ciliados são capazes de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) que são importantes para os organismos cultivados.

No MCCN os nematódeos alcançaram a maior abundância no décimo segundo dia de cultivo ($7,45 \times 10^5 \pm 4,05 \times 10^5$ organismos L⁻¹), possivelmente devido à adição de leveduras. Este fato foi comprovado pela observação de S.

cerevisiae no trato digestório destes metazoários. Em outros experimentos (dados não apresentados) nos quais *S. cerevisiae* foi adicionada mais frequentemente ao cultivo, foram observadas maiores abundâncias de nematódeos. Isto mostra o seu comportamento alimentar oportunista, sugerindo que altas concentrações de nematódeos podem ser obtidas mesmo com menores concentrações de bactérias no meio.

Ballester *et al.* (2010) analisaram a abundância de nematódeos no sistema conhecido como Biofloc-technology aplicado ao sistema de cultivo intensivo de camarões, reportando que eles aparecem próximo ao trigésimo dia de cultivo e alcançam 5×10^3 nematódeos L⁻¹. Silva *et al.* (2008) observaram que nematódeos, juntamente com as diatomáceas, são responsáveis pela maior parte das proteínas e dos lipídios que compõe o biofilme.

Os nematódeos alimentam-se de bactérias e possuem grande importância na cadeia alimentar microbiana (Ruppert *et al.* 2005). Análises bioquímicas realizadas em nematódeos apontaram 48,3 % de proteína, 17,3 % de lipídios e 31,3 % de carboidratos sobre o seu peso seco (Biedenbach *et al.* 1989; Watanabe & Kiron 1994). Rouse *et al.* (1992) reportaram que o conteúdo de ácidos graxos essenciais eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em nematódeos, pode ser superior ao encontrado na *Artemia*.

Silva *et al.* (2008), encontraram uma abundância de aproximadamente $1,4 \times 10^7$ nematódeos por m² de biofilme. Para cobrir o mesmo metro quadrado de biofilme com esta quantidade de nematódeos produzidos no MCCN, e considerando as mesmas concentrações de nematódeos obtidas neste experimento, seriam necessários 20 L de MCCN.

Alguns estudos tem demonstrado a importância em se oferecer alimento vivo de diferentes tamanhos para o melhor crescimento dos organismos produzidos na aquicultura. Por exemplo, diferentes estudos utilizando larvas do peixe *Sparus aurata* (Fernandez-Diaz *et al.* 1994), o caranguejo *Scylla serrata* (Genodepa *et al.* 2004) e moluscos como a *Ostrea chilensis* (Dunphy *et al.* 2006) demonstraram que estes organismos ingerem partículas de tamanho variando de 0,2 à 600 µm. As diferenças de tamanho das partículas ingeridas são atribuídas aos aparatos destinados à alimentação, que sofrem transformações durante o ciclo de vida destes organismos, exigindo desta maneira, o consumo de alimentos de diferentes tamanhos ao longo dos cultivos (Fernandez-Diaz *et al.* 1994; Genodepa *et al.* 2004; Dunphy *et al.* 2006). Apesar da ampla utilização da *Artemia* sp. e dos rotíferos como alimento vivo em larviculturas, estes organismos são muitas vezes difíceis de serem capturados e ingeridos por larvas de pequeno porte, devido ao tamanho inadequadamente grande, resultando em mortalidade por inanição (Treece 2002; Holt 2002).

Em contrapartida, os organismos produzidos no MCCN em diferentes fases de cultivo apresentam tamanhos diferentes, podendo desta maneira, satisfazer a necessidade em termos de tamanho ótimo de partícula para ingestão, pelas espécies ao longo das fases do ciclo de vida. Cabe ressaltar que, protozoários e nematódeos possuem alto valor nutricional, podendo otimizar o crescimento dos organismos cultivados.

Diferentes faixas de tamanho de microorganismos podem ser obtidos no MCCN coletando-os em diferentes períodos de cultivo, ou utilizando filtros para

selecionar organismos do tamanho desejado. Neste estudo, nematódeos foram coletados utilizando uma combinação de filtros, no qual filtros com 300 e 200 μm de abertura de malha capturaram formas adultas de nematódeos, enquanto filtros com abertura de malha de 150 μm capturaram nematódeos jovens. Os flagelados e ciliados foram capturados utilizando-se malhas com tamanho variando de 30 à 100 μm . Filtros com tamanho de malha de 1000 e 500 μm foram utilizados para eliminar partículas maiores das amostras. Filtros com 85, 65, 50, 40 e 30 μm foram também utilizados para selecionar os flagelados e ciliados de acordo com o tamanho desejado. Os organismos concentrados nos filtros foram rapidamente transferidos para menores volumes de água filtrada.

Um problema em potencial observado no MCCN é a alta concentração de amônia medida neste meio. Os valores de amônia total - NAT variaram entre $1,43 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$, na primeira amostragem até $69,26 \pm 9,12 \text{ mg L}^{-1}$ no vigésimo dia de cultivo (Fig. 2)

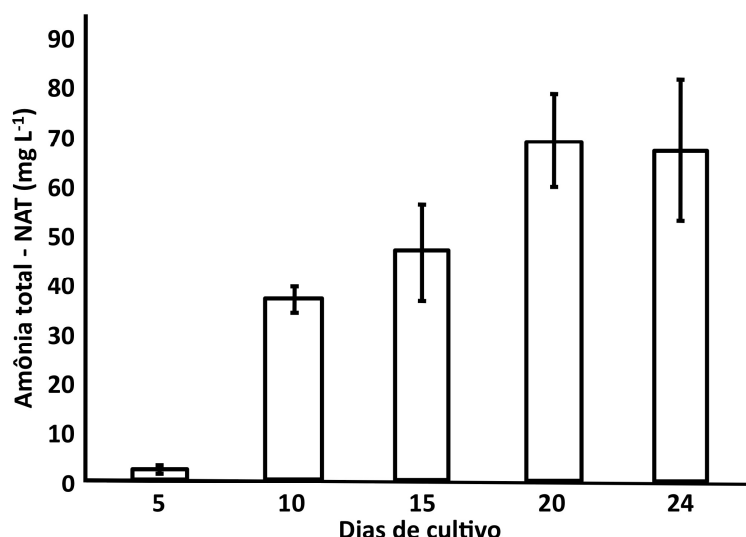


Figura 2: Concentração de Amônia - NAT (MD \pm DP) medida no MCCN nos dias 5, 10, 15, 20 e 24 de cultivo.

Sabe-se que a adição de altas concentrações de amônia em sistemas

de cultivo influencia os processos inerentes à fosforilação oxidativa, afetando a conversão da energia do alimento em ATP. Neste caso, a sobrevivência e crescimento de camarões e peixes em ambientes de cultivo serão comprometidos (Arana 1997; Arana 2002).

Este problema pode ser resolvido de duas formas: a) pela drenagem da água rica em amônia, utilizando os mesmos filtros mencionados acima. Uma vez realizada a drenagem dos microorganismos, a água retornaria aos tanques contendo MCCN e seria reutilizada em outros ciclos de cultivo; b) ou pela adição de fontes de carboidratos com por exemplo o melão.

Esta fonte de carbono é prontamente disponibilizada para as bactérias e beneficia assim a conversão do nitrogênio dissolvido em proteína microbiana, estimulando o incremento na abundância das bactérias nitrificantes. Sabe-se que a presença destas bactérias em viveiros de cultivo de camarões, aumenta a eficiência da conversão protéica por estes crustáceos (Avnimelech, 1999, 2006, 2009, Hari et al. 2006, Samocha 2007,).

Em resumo, com base nos resultados obtidos durante este estudo, pode-se afirmar que o MCCN representa uma alternativa viável para se produzir alimento vivo com diferentes faixas de tamanho utilizando ingredientes de baixo custo de forma eficiente.

Referências Bibliográficas

Arana, L.V. (1997) *Princípios Químicos da Qualidade da Água em Aquicultura*. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 165 pp.

- Arana, L.V. (2002) *Princípios Químicos da Qualidade da Água em Aquicultura*. Segunda edição revisada e ampliada. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 135 pp.
- Avnimelech, Y. (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 174:227-235.
- Avnimelech, Y. (2006) Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacult. Eng.* **34**, 172-178.
- Avnimelech, Y. (2009) *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Ballester, E. L. C., Abreu, P. C., Cavalli, R. O., Emerenciano, M., de Abreu, L. & Wasielesky Jr. (2010) Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquac. Nut.*, **16** (2), p.163-172.
- Berggreen, U., Hansen, B. & Kiorboe, T. (1988) Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.*, **99**, 341-352.
- Biedenbach, J. M., Smith, L. L., Thomsen, T. K. & Lawrence, A. L. (1989) Use of the Nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *J. World Aquac. Soc.*, **20**, 61-71.
- Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G. & Tacon, A. G. J. (2003) Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone) within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquac. Res.*, **34**, 345-355.

- Delbare, D. & Dhert, P. (1996) Cladocerans, Nematodes and Trochophora larvae In: Lavens, P; Sorgeloos, P. (eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.
- Dunphy, B. J., Hall, Jeffs, J. A. & Wells, R. M. G. (2006) Selective particle feeding by the Chilean oyster, *Ostrea chilensis*; implications for nursery culture and broodstock conditioning. *Aquaculture*, **261**, 594-602.
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E. & Yufera, M. (1994) Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.*, **118**, 323-328.
- Genodepa, J., Southgate, P. C. & ZENG, C. (2004) Diet particle size preference and optimal ration for mud crab, *Scilla serrata*, larvae fed microbound diets. *Aquaculture*, **230**, 493-505.
- Gomes, L. A. (2000) The Tao of Aquaculture: cultivating aquatic organisms in concert with their microscopic world. *World Aquaculture*, **31**, 20-61.
- Haché, R., Plante, S. (2011) The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and Artemia (*Artemia salina* strain Franciscana). *Aquaculture*, **311**, 201-208.
- Hagiwara, A., Gallardo, W. G., Assavaaree, M., Kotani, T., Araujo, A. B. (2001) Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, **200**, 111-127.
- Hari, B, Madhusoodana, B. K., Johny, T. V., Schrama, J. W., Verdegem, M. C. J. (2006) The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, **252**,

248-263.

Holt, G. J. (2002) Ornamental Fish Culture, Marine, In: *Encyclopedia of Aquaculture* (Stickney R.R. ed.), pp. 610-614. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Horowitz S. & Horowitz, A. (2002) Microbial intervention in aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C.S. & O'Brian, P. eds.), pp. 119-131. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Loureiro, C. K. (2006) *Sucessão microbiana na degradação de substratos orgânicos associados às leveduras (Sacharomyces cerevisiae): Potencial para utilização na Aqüicultura?* Tese de mestrado, 39 p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Maeda, M. (2002) Microbial communities and their use in aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C.S. & O'Brian, P. eds.), pp. 61-78. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Martinez-Cordova, L.R. (2002) *Camaronicultura, avances y tendencias*. AGT Editor S.A., México, 167 pp.

Martinez-Cordova, L.R., Campaña-Torres, A. & Porchas-Cornejo, M.A. (2002) Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquac. Res.*, **33**, 27-32.

McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G. & Robino, B. (2003) The potential of paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, **223**, 89-106.

Moriarty, D.J.W. (1987) Microbial Ecology in Aquaculture. In: *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture* (Moriarty, D.J.W. & Pullin, R.S.V. eds.), pp.

- 1-4. Proceedings of the Conference on Detrital Systems for Aquaculture, Italy.
- Moriarty, D.J.W. (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. **151**, 333-349.
- Moss M.S. (2002) Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Production Systems* (Lee, C.S. & O'Brian, P. eds.), pp. 1-18. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J. & Cleary, J.J. (2001) Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, **194**, 137-150.
- Phillips, N.W. (1984) Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. *B. Mar. Sci.*, **35**, 283-298.
- Ramesh, M.R., Shankar, K.M., Mohan, C.V. & Varghese T.J. (1999) Comparison of three plant substrates for enhancing carp growth through bacterial biofilm. *Aquacult. Eng.*, **19**, 119-131.
- Rouse, D.B., Webster, C.D. & Radwin, I.A. (1992) Enhancement of the fatty acid composition of the nematode *Panagrellus redivivus* using three different media. *J. World Aquac. Soc.*, **23** (1), 89-95.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S & Barnes, R. D. (2005) *Zoologia dos Invertebrados*. Sétima edição. Editora Roca, São Paulo, 1145 pp.
- Samocha, T. M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A. M., Burger, J. M., Almeida, R. V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A. & Brock, D.L. (2007) Use of

- molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, **36**, 184-191.
- Sieburth, J McN, Smetacek, V. & Lenz, L. (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic components of the plankton and their relationship to plankton size-fractions. *Limnology and Oceanography*, **23**,1256-1263.
- Silva C. F., Ballester, E., Monserrat, J., Geracitano L., Wasielesky, W. & Abreu, P. C. (2008) Contribution of microorganisms to the biofilm nutrition quality: protein and lipid contents. *Aquac. Nut.*, **14**, 507-514.
- Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 293–308.
- Stoecker, D. K., Capuzzo, J. M. (1990) Predation on protozoa: its importance to zooplâncton. *J. Plankton Res.*, **12**, 891-908.
- Stolp, H. (1988) *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. Cambridge University Press. Cambridge, 308 pp.
- Thompson, F. L, Abreu, P. C. & Cavalli, R. (1999) The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, **174**, 139-153.
- Thompson, F L, Abreu, P. C. & Wasielesky, W. (2002) Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, **203**, 263-278.
- Thronsdén, J. 1978. Preservation and storage. In: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton Manual*. Unesco, Paris Chap. 4: 69-74.
- Treece G. D. (2002) Brine Shrimp Culture, In: *Encyclopedia of Aquaculture* (Stickney R. R. ed.), pp. 128-136. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Umesh, N. R., Shankar, K. M. & Mohan, C. V. (1999) Enhancing growth of

- common carp, Rohu and Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm. *Aquacult. Int.*, **7**, 251–260.
- Utermöhl, H. (1958) Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnologie*, **9**, 1–38.
- UNESCO (1983) *Chemical Methods for use in Marine Environmental Monitoring. Manual and Guides*, pp. 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris.
- Van Stappen, G. (1996) Artemia, In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (Lavens, P. & Sorgeloos, P. eds.), pp. 79-250. FAO *Fish. Tech. Pap., Rome*.
- Warwick, R. M. (1987) Meiofauna: Their role in marine detrital systems. In: Moryarti, D. J. W.; Pullin, R. S. V. (Eds.) *Detritus and microbial ecology in aquaculture. (Proceedings of the Conference on Detrital Systems for Aquaculture)*. Bellagio: ICLARM, 282-290p.
- Watanabe, T. & Kiron, V. (1994) Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, **124**, 223- 251.
- Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. (1983) Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, **34**, 115–143.
- Zhucova, N.V. & Kharlamenko, V.I. (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat. Microb. Ecol.*, **17**,153-157.

**Capítulo II – Utilização de protozoários, rotíferos e nematódeos
como alimento vivo para camarões cultivados no sistema
Biofloc-Technology, durante a fase de berçário**

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO, WILSON WASIELESKY JR, PAULO CÉSAR
ABREU

Trabalho aceito para publicação na Revista Atlântica

Utilização de ciliados, rotíferos e nematódeos como alimento vivo para camarões cultivados no sistema BFT

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO¹⁻³, WILSON WASIELESKY JR², PAULO CÉSAR ABREU³

1-Programa de Pós-graduação em Aquicultura – Universidade Federal do Rio Grande - FURG
– C P 474 - CEP: 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil.

2 - Universidade Federal do Rio Grande – Laboratório de Maricultura – Instituto de Oceanografia - FURG

3 - Universidade Federal do Rio Grande – Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos - Instituto de Oceanografia - FURG

e-mail: ckloureiro@gmail.com

Resumo

O Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos – MCCN, possibilita a produção de microrganismos a baixo custo para a utilização como alimento vivo em cultivos de camarões marinhos. Ciliados produzidos no MCCN foram testados como alimento vivo para pós-larvas de camarões em um experimento com quatro tratamentos: BFT - somente biofocos; BFT 10 - 10 mL de MCCN diluído no biofoco; BFT 100 - 100 mL de MCCN diluído no biofoco; e BFT 1000 - 1000 mL de MCCN diluído no biofoco. Os microrganismos foram analisados nas fases inicial, intermediária e final do experimento, realizado durante 30 dias. A análise do conteúdo estomacal dos camarões indicou a predação de ciliados pelas pós-larvas. Na maioria dos tratamentos, o período inicial foi marcado pelo incremento dos flagelados, a fase intermediária foi marcada pela redução na abundância de ciliados e a fase final foi representada pelo aumento na abundância de ciliados e rotíferos. Em nenhum dos tratamentos foram observados nematódeos nas amostras das fases de cultivo analisadas, sugerindo que estes organismos foram efetivamente predados pelos camarões. Este estudo indicou que ciliados, rotíferos e nematódeos, desempenham importante papel como alimento vivo, principalmente pelo seu tamanho reduzido, valor nutricional e atratividade exercida sobre as pós-larvas.

Abstract

The Ciliate and Nematodes Culture Medium – CNCM, enable the inexpensive production of microorganism to be used as live food in shrimp culture. It was tested the ciliates produced by CNCM as live food for shrimp larvae in an experiment with four treatments: BFT - only biofloc medium; BFT 10 - 10 mL of CNCM culture diluted to biofloc; BFT 100 - 100 mL of CNCM culture diluted to biofloc; and BFT 1000 - 1000 mL of CNCM culture diluted to biofloc. The microorganisms were analyzed at the beginning, intermediate and final phases of the experiment which lasted 30 days. The analysis of shrimp gut contents indicated their predation on the ciliates. In most treatments, the initial period revealed significant increase of flagellates, the intermediate phase was marked by the ciliates decrease, and during the final period the abundance of the ciliates and rotifers increased. Nematodes were absent at the end of the final phase in all treatments, suggesting that these organisms were effectively preyed by shrimps. This study indicates that ciliates, rotifers and nematodes play an important role as live food in hatcheries mainly due to their small size, nutritional value and attractiveness exerted on shrimp post-larvae.

Introdução

A técnica conhecida como Biofloc-Technology (BFT) tem como características principais o aumento na biosegurança nos cultivos, a redução nos custos com alimento artificial e troca de água, além de tornar a atividade mais sustentável e ambientalmente correta (Tacon et al. 2002). Neste método de cultivo, existe a produção de macroagregados ou “bioflocos” formados durante o ciclo de produção, que podem servir como alimento complementar para camarões (Avnimelech 2009, Tacon et al. 2002). O biofoco é composto primeiramente por bactérias, cianobactérias, algas, protozoários, pequenos metazoários, formas larvais de invertebrados, fezes e organismos mortos (Burford et al. 2003, Wasielesky et al. 2006, Avnimelech 2009). Alguns destes

microorganismos (bactérias heterotróficas) são capazes de assimilar compostos nitrogenados resultantes da excreção dos camarões, bem como, da decomposição da matéria orgânica (sobras de ração) melhorando, desta maneira, a qualidade de água de cultivo (Avnimelech 2009).

As espécies que compõem a comunidade microbiana influenciam a composição bioquímica do biofloco, seu valor nutricional e possivelmente a sua palatabilidade. Protozoários como os flagelados e ciliados contêm esteróis em sua composição química e grande parte é convertida em colesterol ou outras formas de lipídios. Além disso, a biomassa seca dos organismos eucarióticos é composta por 50% de proteína, 10% de lipídios, 10 - 20% de carboidratos, 3 - 4% de RNA e DNA (Stolp 1988). Da mesma forma, análises bioquímicas dos nematódeos apontaram 48,3 % de proteína, 17,3 % de lipídios e 31,3 % de carboidratos sobre o seu peso seco (Biedenbach *et al.* 1989; Watanabe & Kiron 1994) mas estes níveis são estritamente dependentes da qualidade nutricional do substrato onde os nematódeos são cultivados.

Desta forma, a adição de microorganismos cultivados no sistema BFT, especialmente os ciliados e nematódeos podem incrementar a disponibilidade de proteínas e lipídios, melhorando o crescimento dos organismos cultivados (Phillips 1984; Stolp 1988, Biedenbach *et al.* 1989, Decamp *et al.* 2002, Focken *et al.* 2006) e reduzindo a utilização de proteína procedente do alimento comercial (Samocho *et al.* 2004).

Utilizando conceitos propostos por Martinez-Cordova (2002) desenvolveu-se o meio de cultivo de ciliados e nematódeos - MCCN, uma técnica de produção massiva de microorganismos que possibilitou fornecer um

outro tipo de alimento vivo ao cultivo de camarões. Este método utiliza feno de alfafa e melaço de cana-de-açúcar, entre outros, para estimular o crescimento de microrganismos (Loureiro et al. em preparação). As bactérias atuam na decomposição da matéria orgânica utilizando o carbono como fonte de energia e o nitrogênio para formar sua estrutura celular, através da síntese de proteínas. O crescimento bacteriano permite o estabelecimento de uma cadeia alimentar microbiana composta por: flagelados, ciliados e nematódeos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da complementação do sistema BFT com ciliados produzidos pelo MCCN, sobre a sobrevivência e no peso final dos camarões *Litopenaeus vannamei*.

Material e Métodos

Local de estudo

Este estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura - EMA/FURG na Praia do Cassino – Rio Grande – RS. O experimento iniciou em 1 de fevereiro de 2010, com a duração de 30 dias.

Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos - MCCN

Para produzir os microorganismos que posteriormente enriqueceram o biofoco durante os 30 dias de experimento, foram utilizados 6 tanques cilindro-cônicos com capacidade para 50 L, equipados com sistema de aeração e aquecimento para manter a água com temperatura próxima à 38 °C.

Para estimular o crescimento dos microorganismos foram adicionados em 50 litros de água marinha filtrada (filtros cartucho 5 µm Cuno®), 20 g L⁻¹ de melaço de cana-de-açúcar (aplicados durante 3 dias consecutivos), 18 mL L⁻¹

de óleo de pescado, 2 g L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae*, 0,2 g L⁻¹ de vitamina C e 100 g L⁻¹ de feno de alfafa (Loureiro et al., em preparação). Como inóculo de microorganismos foi utilizado 50 mL L⁻¹ de água (salinidade 20) coletada no estuário da Lagoa dos Patos. Todos os ingredientes foram misturados e mantidos sob aeração com temperatura próxima à 38 °C.

Unidades experimentais - UEs

Para o cultivo de camarões em meio à bioflocos enriquecidos com microorganismos, foram utilizados como unidades experimentais 16 frascos plásticos com volume útil de 4 litros, equipados com sistema de aeração individual.

Delineamento experimental

Este experimento foi dividido em 4 tratamentos: a) somente bioflocos (BFT); b) 10 mL de MCCN adicionado ao bioflocos (BFT 10); c) 100 mL de MCCN adicionado ao bioflocos (BFT 100) e d) 1000 mL de MCCN adicionado ao bioflocos (BFT 1000).

Bioflocos - BFT

O BFT utilizado durante o experimento foi coletado de um tanque de engorda de juvenis de *L. vannamei*, pertencente às estruturas da Estação Marinha de Aquicultura – EMA/FURG.

Durante o estudo, as unidades experimentais (UE) permaneceram em Banho-Maria com temperatura controlada (28 °C) e aeração constante. Cada UE recebeu 50 pós-larvas L⁻¹ de *L. vannamei* (PL 8) com peso médio de 0,006 ± 0,003 g, as pós-larvas utilizadas neste estudo foram obtidas na larvicultura da

Estação Marinha de Aquicultura - EMA/IO-FURG. A taxa de sobrevivência foi estimada pela contagem dos camarões no início e ao final do experimento.

Manutenção das unidades experimentais

A água nas UEs foi renovada à cada 48 horas (ciclo de renovação) através do sifonamento de aproximadamente 90% do volume total, para manter as mesmas características do bioflocos em todos os tratamentos durante o experimento. O volume original foi restabelecido pela adição de água com BFT e a mesma quantidade pré-estabelecida de MCCN foi adicionada em cada UE.

Análise dos microorganismos

Em consequência do grande número de amostras e a impossibilidade de todas as amostras serem analisadas, foi estabelecido três fases durante o cultivo para a quantificação e qualificação dos microorganismos. As análises foram realizadas na fase inicial de cultivo que corresponde o período entre os dias 7/2 e 9/2, na fase intermediária entre os dias 17/2 e 19/2 e na fase final de cultivo entre os dias 27/1 e 1/1 (Tabela 1). Desta forma, foi possível analisar as variações quali-quantitativas das comunidades de microorganismos dentro das 48 horas correspondentes.

Para isso, uma alíquota de 50 mL de água de cultivo foi coletada de cada UE logo após a renovação de água e adição do MCCN. A segunda amostra foi coletada após 48 horas e momentos antes da próxima renovação.

Tabela 1: Amostragens nas diferentes fases de cultivo para quantificação e qualificação das comunidades de microorganismos adicionadas ao bioflocos

Fase inicial	Fase intermediária	Fase final
7/2 e 9/2	17/2 e 19/2	27/2 e 1/3

As amostras coletadas foram preservadas em solução de Lugol 2% (v:v) e estocadas em frascos âmbar (50 mL) para posterior análise. Alíquotas de 2,1 mL de cada amostra foram analisadas em câmaras de sedimentação (Thronsen 1978).

Para a quantificação, os microorganismos foram categorizados em diferentes faixas de tamanho (Sieburth 1978). A classe dos nematódeos medindo de 200 à 1000 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 100X, os ciliados medindo de 20 à 80 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 200X e os flagelados medindo até 14 μm foram quantificados utilizando objetiva com magnificação de 400X (Utermöhl 1958) utilizando um microscópio invertido Axiovert 135 (ZEISS). Para garantir a contagem mínima de 100 células/indivíduos, foram contadas 3 faixas para cada classe de tamanho de microorganismos.

Parâmetros físico-químicos

Um sensor da marca YSI™ mod. 556 foi utilizado para realizar as medidas diárias de temperatura da água, salinidade, pH e oxigênio dissolvido. Os sólidos em suspensão e a concentração da amônia total – NAT foram determinados (UNESCO, 1983) ao final de cada fase de cultivo (inicial, intermediária e final). O cone Imhoff foi utilizado para determinar o volume de material em suspensão acumulado no fundo do cone 15 minutos após a amostragem (Avnimelech 2007).

Alimentação das pós-larvas

A alimentação era realizada 3 vezes ao dia, com a ração inicial (Guabi -

Active 38% CP) triturada em granulometria aproximada de 300 μ m e equivalente à 50% da biomassa de camarões em cada UE (0,15 g dia⁻¹). A partir do quarto dia de cultivo o fornecimento de ração passou a ser ajustado diariamente, considerando a sobra de ração no fundo das UEs resultante da última alimentação.

Análise do conteúdo estomacal dos camarões

Estas análises foram realizadas em 5 camarões coletados nas três fases de cultivo. Utilizando bisturi e agulhas de dissecação o compartimento estomacal dos camarões era extraído e colocado sobre lamina. Um corte transversal era realizado para obter a porção anterior deste órgão.

A parte anterior do estômago era corado (solução de Lugol - 2%) e o conteúdo extravasado entre lâmina e lamínula para análise qualitativa sob um microscópio óptico Axiovert 135 (ZEISS), nos aumentos de 100X, 200X e 400X.

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA - unifatorial) foi aplicada para detectar diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência, peso final dos camarões, oxigênio dissolvido, concentração de amônia - NAT e abundância inicial e final de microrganismos. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram determinadas utilizando o teste de Tukey (Zar 1999).

Resultados

Índices Zootécnicos

A taxa de sobrevivência e peso final dos camarões estão apresentados

na tabela 2. Os camarões apresentaram maior sobrevivência nos tratamentos BFT 100 e BFT 1000 quando comparados com o tratamento controle (BFT). O maior valor para o peso final dos camarões foi observado no tratamento BFT 10 seguido pelo tratamento BFT.

Tabela 2: Índices zootécnicos finais ($Md \pm Dp$) das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* submetidos aos tratamentos BFT, BFT 10, BFT 100 e BFT 1000. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Variáveis	BFT	BFT 10	BFT 100	BFT 1000
Sobrevivência (%)	44±2,6 ^a	42±3,2 ^a	53,5±4,2 ^b	54±3,4 ^b
Peso final (g)	0,068±0,003 ^a	0,085±0,003 ^b	0,059±0,002 ^c	0,048±0,002 ^d

Parâmetros de Qualidade de água

Como mostrado a seguir (Tab. 2), as concentrações de oxigênio dissolvido nos tratamentos BFT e BFT 10 durante o experimento foram maiores e estatisticamente diferentes dos demais tratamentos; o mesmo foi observado para os valores da amônia – NAT. Os dados referentes à temperatura, salinidade, pH e sólidos sedimentáveis não apresentaram diferenças significativas durante o experimento (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetro de qualidade de água (MD±DP) nos tanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei* submetidos aos tratamentos BFT, BFT 10, BFT 100 e BFT 1000 durante o cultivo. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Variáveis	BFT	BFT 10	BFT 100	BFT 1000
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	7,29 ± 0,32 ^a	7,24 ± 0,41 ^a	6,35 ± 0,36 ^b	4,60 ± 1,35 ^c
Temperatura (°C)	28,02 ± 0,37	28,12 ± 0,26	28,02 ± 0,37	28,12 ± 0,27
Amônia Total - NAT (mg L ⁻¹)	0,79 ± 0,19 ^a	0,30 ± 0,14 ^b	nd	nd
Salinidade (‰)	32,6 ± 0,5	32,6 ± 0,5	32,6 ± 0,5	32,6 ± 0,5
pH	7,9 ± 0,18	7,9 ± 0,22	8,1 ± 0,17	8,2 ± 0,14
Cone Imhoff (ml L ⁻¹)	8,7 ± 4,2	9,9 ± 3,8	9,6 ± 5,8	7,7 ± 5,5

Análise dos microorganismos

A abundância de flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos na fase inicial (7 de Fevereiro) está apresentada na figura 1. Neste período do experimento houve incremento significativo de flagelados na maioria dos tratamentos, exceto no tratamento BFT 100 (Fig. 1B). De modo geral as populações dos organismos maiores como os rotíferos e nematódeos, apresentaram declínio principalmente nos tratamentos BFT 100 e BFT 1000, respectivamente (Figuras 1F e 1H).

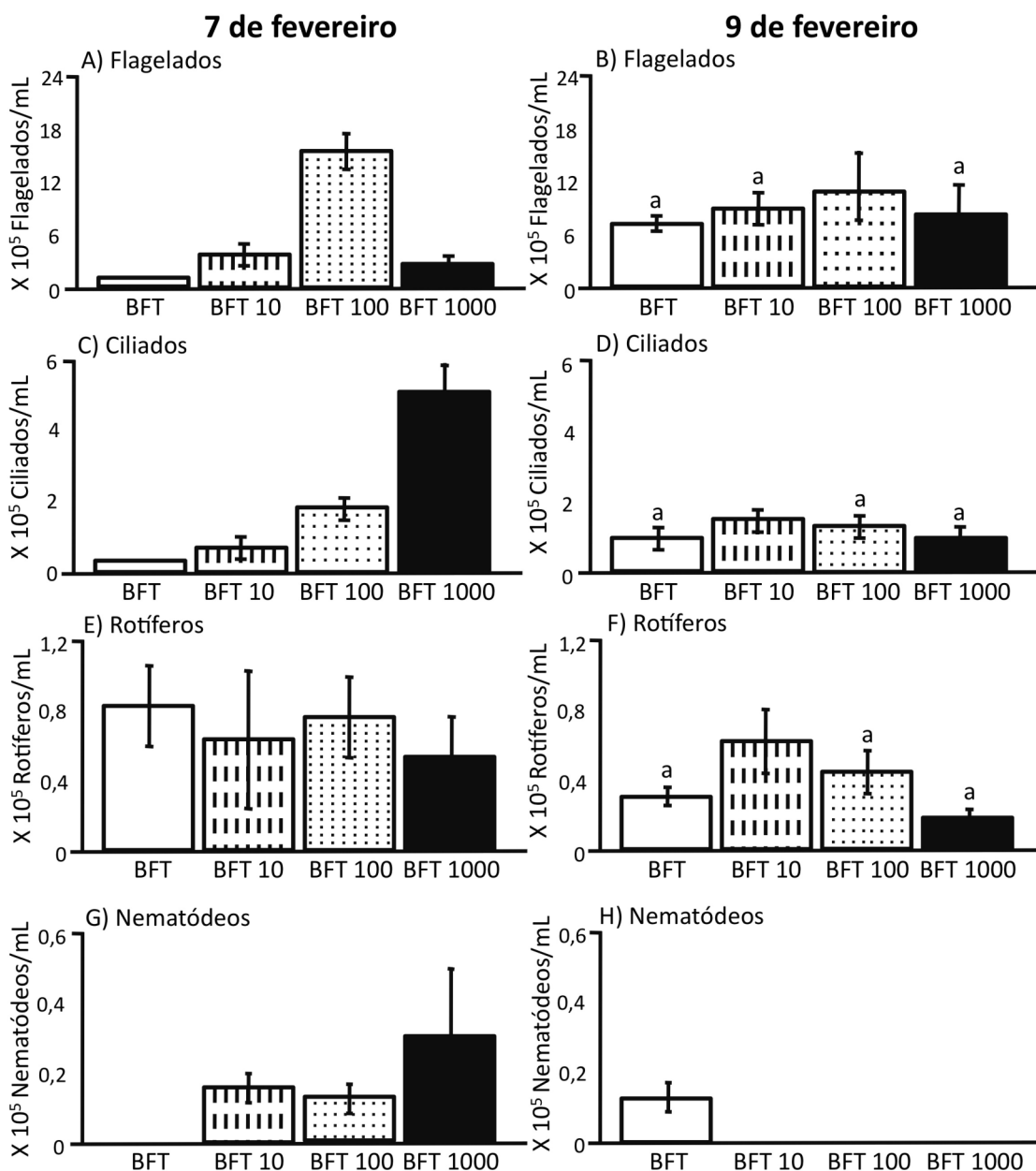


Figura 1: Abundância de Flagelados (A-B), Ciliados (C-D), Rotíferos (E-F) e Nematódeos (G-H) no início (7 de Fevereiro) e término (9 de Fevereiro) da fase inicial de cultivo. A letra a sobre as barras (figuras do lado direito) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações inicial e final.

O aumento significativo na abundância de flagelados 48 horas após a adição de MCCN também foi observado na fase intermediária de cultivo (17 de Fevereiro), nos tratamentos BFT 10 e BFT 1000 (Fig. 2B). Entretanto, notou-se o significativo declínio na população de ciliados nos tratamentos: BFT 100 e BFT 1000 (Fig. 2D). Igualmente como observado na fase inicial, a abundância

de rotíferos na fase intermediária declinou (Fig. 2F) e os nematódeos estiveram ausentes ao final da fase intermediária (Fig. 2H).

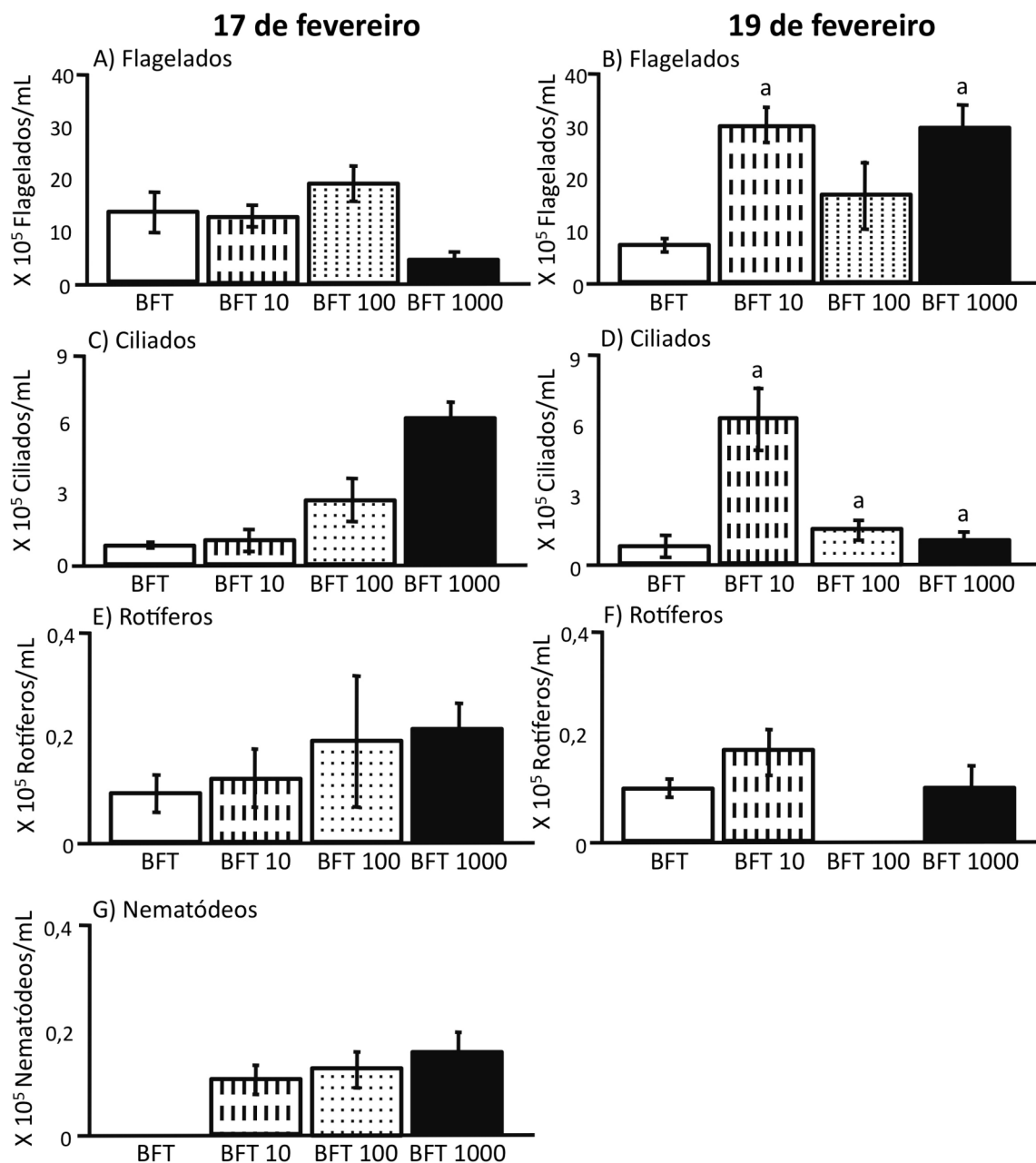


Figura 2: Abundância de Flagelados (A-B), Ciliados (C-D), Rotíferos (E-F) e Nematódeos (G-H) no início (17 de Fevereiro) e término (19 de Fevereiro) da fase inicial de cultivo. A letra *a* sobre as barras (figuras do lado direito) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações inicial e final.

Os flagelados aumentaram ao término da fase final somente no tratamento BFT 10 (Fig. 3B). Por outro lado, a fase final (27 de Fevereiro) foi representada pelo incremento na abundância de ciliados nos tratamentos BFT

10 e BFT 1000; a abundância de rotíferos foi incrementada na maioria dos tratamentos, exceto no tratamento BFT (Fig. 3F). Apesar da presença de nematódeos no tratamento BFT 1000, não foram observados estes organismos nos demais tratamentos ao término da fase final.

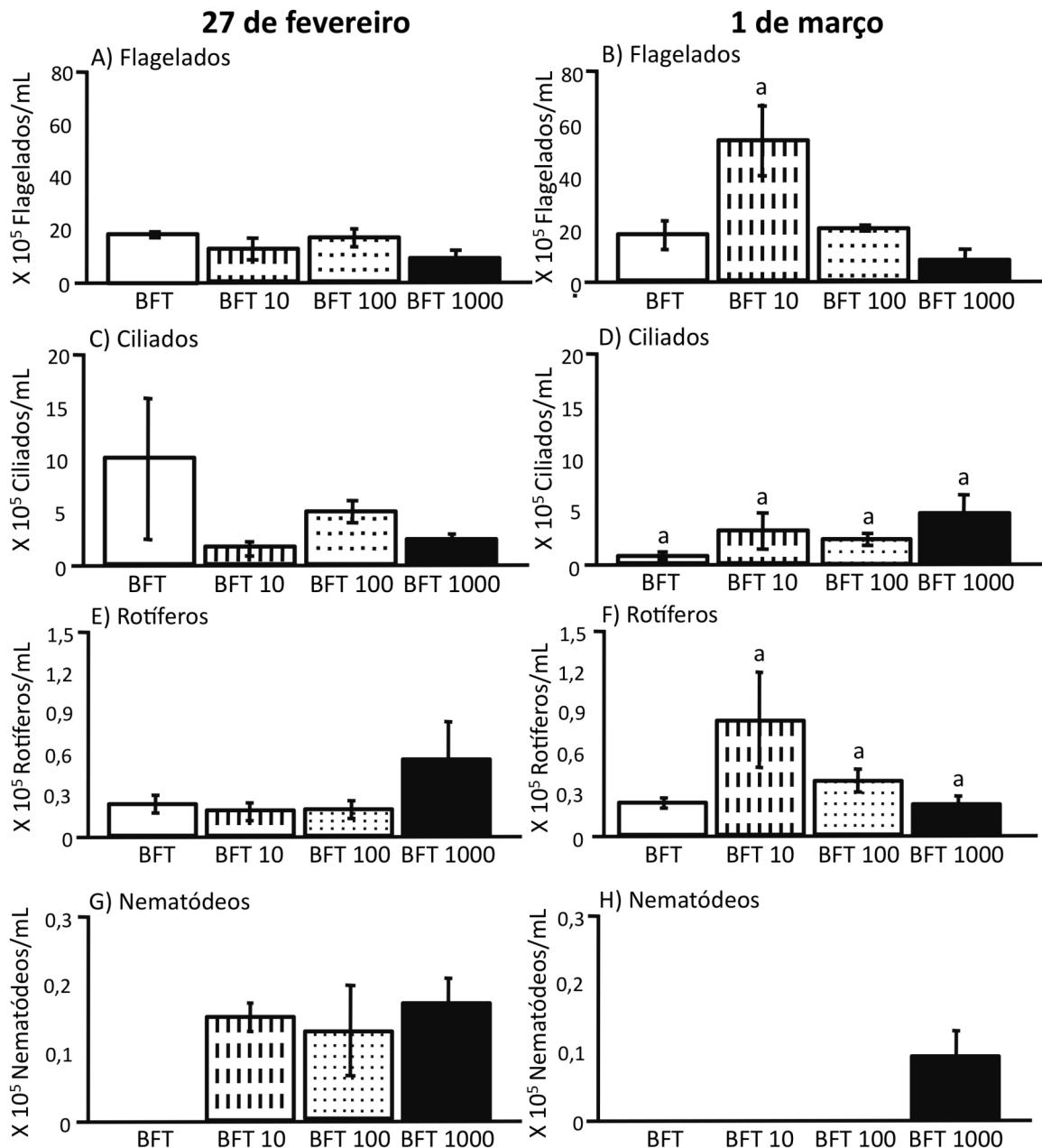


Figura 3: Abundância de Flagelados (A-B), Ciliados (C-D), Rotíferos (E-F) e Nematódeos (G-H) no início (27 de Fevereiro) e término (1 de Março) da fase inicial de cultivo. A letra a sobre as barras (figuras do lado direito) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações inicial e final.

Análise do conteúdo estomacal dos camarões

Embora os ciliados e rotíferos observados no estômago dos camarões encontraram-se parcialmente digeridos, foi possível observar sua presença principalmente nas fases inicial e intermediária, indicando a predação destes organismos preferencialmente nos primeiros estágios de vida.

Discussão

O Promotor da Produtividade Natural - PPN foi desenvolvido por Martinez-Cordova (2002) como estratégia para incrementar a abundância de organismos zooplancctônicos em cultivos extensivos de camarões. Estes autores verificaram que o PPN favorece o crescimento de microorganismos benéficos ao ambiente de cultivo e aos organismos cultivados (Martinez-Cordova 2002; Martinez-Cordova et al. 2002). Algumas adaptações nesta técnica como por exemplo a utilização de aquecedores de água e aeradores, levou ao desenvolvimento do MCCN, que promove o desenvolvimento de uma cadeia alimentar microbiana, originalmente representada por espécies de flagelados, ciliados como *Uronema sp.*, *Litonotus sp.* seguidos por *Euplotes sp.* e finalmente pelos nematódeos (*Rhabditis sp.*) (Loureiro et al. em preparação).

Estes microorganismos são importante fonte de lipídios, proteínas e vitaminas para os organismos cultivados (Biedenbach et al. 1989; Moriarty 1997; Stoecker & Capuzzo 1990; Zhukova & Kharlamenko 1999; Thompson et al. 2002; Decamp et al. 2002; Horowitz & Horowitz 2002). Além de servir como fonte direta de nutrientes para o camarão, existem evidências de que flagelados, ciliados e nematódeos também exercem efeito positivo sobre a atividade enzimática digestiva dos camarões, bem como, sobre a microflora

intestinal destes crustáceos (Moss et al. 2001). Contudo, neste trabalho a aplicação de maiores volumes de MCCN nos tratamentos BFT 100 e BFT 1000, não refletiu no maior crescimento dos camarões. Ao final do experimento os camarões cultivados nos tratamentos BFT 10 e BFT apresentaram o maior peso, provavelmente devido à menor sobrevivência nestes tratamentos (Tab. 1).

As análises qualitativas e quantitativas das populações de microorganismos heterotróficos adicionados ao BFT, revelaram que ciliados e rotíferos foram predados principalmente nas fases inicial e intermediária de cultivo (Figs. 1, 2 e 3). Acredita-se que a menor relação de tamanho entre presa e predador nestas fases tenha sido o fator preponderante, permitindo que estes microorganismos tenham sido diretamente predados pelos camarões. Estes resultados foram comprovados por análises do conteúdo estomacal dos camarões, onde ciliados e rotíferos foram encontrados somente nas fases inicial e intermediária de cultivo. Outros pesquisadores também comprovaram a importância dos ciliados (Thompson et al. 2002; Decamp & Nagano 2004) e rotíferos, especialmente nos primeiros estágios de vida dos organismos cultivados, devido ao seu tamanho reduzido e conteúdo protéico (Furuya 2001, Ribeiro 2001a). É interessante notar que na fase final do experimento, quando os camarões se encontravam maiores, a abundância de ciliados aumentou 48 horas após a sua adição, indicando que os camarões passaram a selecionar presas maiores como, por exemplo, os nematódeos.

Os nematódeos, por outro lado, foram praticamente dizimados em todas as fases de cultivo, sugerindo uma possível pressão de predação dos

camarões sobre os metazoários, provavelmente devido à este organismo ser mais atrativo aos seus predadores, como reportado por Biedenbach et al. (1989). Análises bioquímicas realizadas em nematódeos apontaram níveis de proteína, lipídio e carboidrato de 48.3%, 17.3% e 31.3% respectivamente, do peso seco, níveis estes que variam de acordo com a qualidade nutricional do substrato utilizado como meio, onde são cultivados (Biedenbach et al. 1989; Focken et al. 2006).

Embora a abundância de microorganismos não tenha apresentado diferença significativa entre os tratamentos é provável que o grande número de microorganismos nos tratamentos BFT 100 e BFT 1000 concomitante à maior sobrevivência dos camarões neste tratamentos, tenham contribuído para os menores valores de DO, devido ao suposto aumento da respiração no sistema de cultivo (Moriarty 1987). Alguns estudos indicam que o oxigênio dissolvido é o principal fator limitante para o crescimento de camarões peneídeos, mostrando que a queda nos níveis de OD nos viveiros de cultivo pode inibir seu crescimento e conseqüentemente a acídise (Clark 1986). O consumo de oxigênio é uma importante via do equilíbrio bioenergético do camarão, interferindo no fluxo de energia que é direcionada ao metabolismo basal. Apesar de não atuar diretamente no crescimento ou digestibilidade do alimento, o OD pode limitar o consumo alimentar e conseqüentemente as taxas de crescimento do camarão (Lucas 1993; Rosas et al. 1998). Ambientes de cultivo com baixos níveis de OD, resultaram em baixo peso final dos camarões (Rosas et al. 1998; Arana 1997; Ribeiro 2001b, Li et al. 2006). Contudo, acredita-se que o baixo peso final dos camarões nos tratamentos BFT 100 e BFT 1000,

ocorreram pela falta de alimento artificial nestes tratamentos, onde a sobrevivência foi em torno de 10% maior.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que: ciliados e nematódeos produzidos massivamente no MCCN, podem tornar-se eficiente fonte de alimento vivo para o cultivo de camarões devido à facilidade de cultivo e valor nutricional. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de melhorar a sobrevivência dos camarões cultivados sob altas densidades, utilizando o MCCN como elemento enriquecedor do biofloc.

Referências Bibliográficas

Arana, L.V. 1997. Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura.

Florianópolis, Editora da UFSC. 165 p.

Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264: 140-147.

Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Biedenbach, JM, LL Smith, TK Thomsen & A Lawrence. 1989. Use of the Nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *Journal World Aquaculture Society*, 20: 61-71.

Buford, MA, PJ Thompson, RH Bauman & DC Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensive, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219: 393-411.

Clark, J. 1986. Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (Haan) by long-term hypoxia. *Aquaculture*, 52: 253-254.

- Decamp, O., L. Conquest, I. Forster & A.G.J Tacon. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. In: Lee, C.S. & P O`Bryen (eds.). *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Enviromentally Sound Aquaculture Production Systems*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Chap. 5: 79-86.
- Decamp, O & N Nagano. 2004. Ingestion of a ciliated protozoa by first-feeding larval stage of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 35: 516-518.
- Focken, U, C Schlechtriem, A Garc, A Puello-Cruz & K Becker. 2006. *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquac. Res.*, **37**, p. 1429-1436.
- Furuya, W.M. 2001. Nutrição de peixes. In: Moreira, H.L.M., L Vargas, R.P. Ribeiro & S. Zimmermann (Eds.). *Fundamentos da Moderna Aquicultura*. Ed. Ulbra, Canoas, Chap. 8: 59–68.
- Horowitz, S. & A Horowitz. 2002. Microbial intervention in aquaculture. In: Lee, C-S & P O`Bryen (eds) *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Enviromentally Sound Aquaculture Production Systems*. Baton Rouge, The World Aquaculture Society, 119-131.
- Li Y, J Li & Q Wang. 2006. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 256: 608-616.
- Lucas, A. 1993. *Bioénergétique Des Animaux Aquatics*. Masson, Paris.180 p.
- Loureiro CK, W Wasielesky & PC Abreu. Method for Mass Production of

Protozoa and Nematodes (em preparação).

Martinez-Cordova, L.R. 2002. Camaronicultura, avances y tendencias. México, AGT Editor S.A. 167p.

Martinez-Cordova, LR, A Campaña-Torres & MA Porchas-Cornejo. 2002. Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquaculture Research*, 33: 27-32.

McIntosh, BJ, TM Samocha, ER Jones, AL Lawrence, DA Mckee, S Horowitz & A Horowitz. 2000. The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet on outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21: 215-227.

Moriarty, DJW. 1987. Microbial Ecology in Aquaculture. In: Moriarty, D.J.W., R.S.V. Pullin (eds.). *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture. Proceedings of the Conference on Detrital Systems for Aquaculture. Italy, Chap. 1: 1-4.*

Moriarty, DJW. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151: 333-349.

Moss. S.M., S Divakaran & B G Kim. 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Res.*, 32; 125– 132.

Phillips, NW. 1984. Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. *Bulletin of Marine Science*, 35: 283-298.

- Ribeiro, RP. 2001a. Estrutura das comunidades aquáticas. In: Moreira, H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro & S. Zimmermann (Eds.). Fundamentos da Moderna Aquicultura. Ed. Ulbra, Canoas, Chap. 4: 33–36.
- Ribeiro, R.P. 2001b. Ambiente e Água para a Piscicultura, In: Moreira, H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro & S. Zimmermann (Eds.). Fundamentos da Moderna Aquicultura. Ed. Ulbra, Canoas, Chap. 5: 37–43.
- Rosas, C, E Martinez, G Gaxiola, R Brito, R Diaz-Iglesia & L Soto. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. Marine Ecology Progress Series 174: 67-75.
- Samocha, TM, IM Lopez, ER Jones, S Jackson & L Lawrence. 2004. Characterization of intake and effluent waters from intensive and semi-intensive shrimp farms in Texas. Aquaculture Research 35: 321-339.
- Sieburth, J McN, V Smetacek & L Lenz. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic components of the plankton and their relationship to plankton size-fractions. Limnology and Oceanography, 23:1256-1263.
- Stoecker, DK & JM Capuzzo. 1990. Predation on protozoa: its importance to zooplâncton. Journal of Plankton Research, 12: 891-908.
- Stolp, H. 1988. Microbial ecology: organisms, habitats, activities. Cambridge University Press. 308p.
- Tacon, A. G. J., Cody, L. D., Conquest, J. J., Divakaran, S., Forster, I. P. & Decamp, O. E. (2002) Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac. Nut.*, **8**, p.121-137.

- Thompson, FL, PC Abreu & W Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203: 263-278.
- Thronsen, J. 1978. Preservation and storage. In: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton Manual*. Unesco, Paris Chap. 4: 69-74.
- Unesco. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. *Manual and Guides*, Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris. 53p.
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Verhandlungen Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9: 1-38.
- Watanabe T & V Kiron. 1994. Review prospects in larval nutrition. *Aquaculture* 124: 223-251.
- Wasielesky, W, M Emerenciano, E Ballester; R Soares, R Cavalli & PC Abreu. 2006. Flocos Microbianos: um novo caminho a ser percorrido. *Revista Panorama da Aqüicultura*, 96: 14-23.
- Zar, J.H., 1999. *Bioestatistical analysis*. New Jersey. Prentice-Hall. 660p.
- Zhukova, N & V Kharlamenko. 1999. Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquatic Microbial Ecology*, 17: 153-157.

Capítulo III – Cultivo de Camarões *Litopenaeus vannamei* na fase de berçário em Meio à Bioflocos enriquecido com Nematódeos *Rhabditis* sp.

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO, KÁSSIO RIOS DA SILVA, WILSON WASIELESKY JR, PAULO CÉSAR ABREU

Cultivo de Camarões *Litopenaeus vannamei* em Meio à Bioflocos enriquecido com Nematódeos *Rhabditis* sp.

CLÁUDIO KINACH LOUREIRO¹, KÁSSIO RIOS DA SILVA², WILSON WASIELESKY JR³, PAULO CÉSAR ABREU³

1 - Programa de Pós-graduação em Aquicultura – Universidade Federal do Rio Grande - FURG – C P 474 - CEP: 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil.

2 - Programa de Pós-graduação em Ocenografia Biológica – Universidade Federal do Rio Grande - FURG – C P 474 - CEP: 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil.

3 - Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Resumo

Neste estudo, o cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei* em meio à bioflocos foi enriquecido com 1000, 5000 e 10000 nematódeos L⁻¹ (tratamentos N1, N5 e N10, respectivamente). Os camarões cultivados nestes tratamentos apresentaram maior peso final (0,15; 0,14 e 0,13 g, respectivamente) em comparação com camarões do tratamento controle (0,09 g) (BFT - apenas bioflocos). A sobrevivência dos camarões ao final do experimento foi significativamente maior no tratamento N5 (94 ± 5 %). Os rotíferos presentes no meio BFT também sofreram redução em praticamente todas as fases de cultivo analisadas. A análise do conteúdo estomacal dos camarões confirmou que rotíferos e nematódeos foram consumidos. O enriquecimento do BFT com nematódeos se mostrou uma alternativa para aumentar a produtividade dos camarões de maneira econômica.

Palavras-chave: bioflocos, alimento vivo, cultivo de microorganismos, metazoários

Abstract

In this study, the shrimps *Litopenaeus vannamei* was cultured in biofloc based medium. The biofloc was enriched with 1000, 5000 and 10000 nematodes L⁻¹ (treatments N1, N5 and N10, respectively). In these treatments the shrimps showed higher final weight (0.15, 0.14 and 0.13 g, respectively) when compared with shrimp reared in the control treatment (0.09 g) (BFT - just biofloc). The survival of shrimp at the end of the experiment was significantly higher in the treatment N5 (94 ± 5%). The rotifers in the biofloc have declined in all stages analyzed during this experiment. The stomach contents analysis of shrimps confirmed that rotifers and nematodes were consumed. The biofloc enrichment with nematodes showed a way to increase the productivity of shrimp by the economical way.

Keywords: biofloc, live feed, culture of microorganisms, metazoan

Introdução

O rápido crescimento da aquicultura nas últimas décadas possibilitou o aumento na produção mundial de pescados provenientes desta atividade, na qual larvas de peixes, moluscos e crustáceos são produzidas em laboratório (Schlechtriem et al. 2002). Porém, esta

produção requer a utilização de organismos como alimento vivo; e a produção de alimento vivo por sua vez, requer instalações próprias e conhecimento técnico (Schlechtriem et al. 2002).

Em laboratórios de produção comercial, uma das dificuldades encontradas na produção de larvas de peixes e crustáceos é a dependência destes organismos pelo alimento vivo durante suas fases larvais (Lavens & Sorgeloos 1996; Sorgeloos et al. 2001).

Larvas de espécies aquáticas possuem reservas nutricionais limitadas e sua sobrevivência depende da disponibilidade de alimento exógeno. Sob condições de cultivo, normalmente elas são alimentadas com duas ou três espécies de alimento vivo para garantir seu potencial de crescimento e sobrevivência (Izquierdo 2004).

As microalgas e copépodos são dominantes no plâncton e formam a base alimentar de muitas formas larvais de organismos marinhos. Outro item alimentar de larvas aquáticas são nematódeos (Hall et al. 2004). A produção de nematódeos se tornou uma área de interesse no sentido de torná-los um alimento que possa substituir a *Artemia*, que é amplamente utilizada como alimento vivo para larvas de espécies cultivadas (Hall et al. 2004), porém, possuem alto custo e sazonalidade na produção.

O alimento vivo precisa ser de fácil obtenção, reprodução e preferencialmente deve ser produzido de forma econômica (Watanabe & Kiron, 1994) diminuindo desta forma, o seu custo de produção. Como não existe uma formulação artificial para substituir a *Artemia*, o alimento vivo ainda é essencial para o desenvolvimento da aquicultura. Contudo, a qualidade nutricional das linhagens de *Artemia* disponíveis comercialmente são pobres em ácido eicosapentaenóico EPA, 20:5 n -3. e, também o ácido graxo docosahexaenóico DHA, 22:6 n -3. (Sorgeloos & Candreva 2001).

Já foi observado que o nematódeo terrestre de vida livre *Panagrellus redivivus* pode

ser utilizado como fonte de alimento vivo para larvas de peixes e crustáceos, representando uma alternativa para substituição da *Artemia* nas larviculturas destas espécies (Sautter et al. 2007). Com tamanho reduzido e forma alongada, estes metazoários servem de alimento vivo para larvas de peixes e camarões peneídeos. Entretanto, estes nematódeos não são utilizados na aquicultura comercial devido à dificuldade de produção (Sautter et al. 2007).

A produção massiva de nematódeos é possível utilizando-se o meio de cultivo de ciliados e nematódeos – MCCN (Loureiro et al., em prep). Esta técnica utiliza o feno de alfafa e o melaço de cana-de-açúcar como meio para estimular o crescimento de flagelados, ciliados e nematódeos da espécie *Rhabditis sp.* que é espontaneamente induzido pelo MCCN (Loureiro et al. em preparação). O nematódeo *Rhabditis sp.* apresenta distribuição cosmopolita e comumente está associado à decomposição de algas marinhas e à matéria orgânica dos mangues (Warwick 1987).

Ballester, et al. (2010) promoveram o desenvolvimento de flocos microbianos na coluna de água de cultivo (Biofloc technology - BFT) de juvenis de *Farfantepenaeus paulensis*, utilizando altas taxas de aeração e fertilização com farelo de trigo e melaço. Os flocos foram constituídos por material orgânico e colonizados por bactérias heterotróficas, flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos. Este mesmo autor analisou a abundância de nematódeos no sistema BFT em cultivo intensivo de camarões, reportando que nematódeos surgiram no sistema apenas no trigésimo dia de cultivo, alcançando 5×10^3 organismos L⁻¹.

Silva et al. (2008) observaram que os maiores níveis de proteína e lipídio encontrados no biofilme, estavam relacionados aos períodos quando os nematódeos foram mais abundantes.

Com base nestes resultados, acredita-se que o enriquecimento do sistema BFT com nematódeos desde o início do cultivo dos camarões, poderá incrementar o crescimento e

sobrevivência dos camarões cultivados.

Neste trabalho avaliou-se o efeito do enriquecimento do sistema BFT com nematódeos *Rhabditis* sp., produzidos no MCCN, sobre a sobrevivência e peso final dos camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados neste sistema.

Material e métodos

Este estudo foi realizado nas dependências da Estação Marinha de Aquicultura – EMA/IO-FURG, localizada na Praia do Cassino - Rio Grande – RS. O experimento foi realizado entre os meses de março e abril de 2010, durante o período de 18 dias.

Desenho experimental

Para a execução deste trabalho foram utilizados 12 frascos com volume útil de 4 litros (unidades experimentais - UEs), divididos em 4 tratamentos: (BF) bioflocos, (N1) bioflocos acrescido de 1000 nematódeos L⁻¹, (N5) bioflocos acrescido de 5000 nematódeos L⁻¹, (N10) bioflocos acrescido de 10000 nematódeos L⁻¹.

Durante o estudo as UEs permaneceram em banho-maria com temperatura controlada (28° C) e aeração constante. Cada réplica recebeu 6 pós-larvas (PL 45) camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* L⁻¹, com peso médio inicial de 0,0645 ± 0,0147 g.

Fornecimento de ração

Para todos os tratamentos a ração inicial (Guabi - Active 38% CP) foi triturada e oferecida em uma granulometria aproximada de 300µm e equivalente à 50% da biomassa de camarões em cada UE (0,19 g dia⁻¹). A partir do quarto dia de cultivo o fornecimento de ração passou a ser ajustado diariamente, considerando a sobra de ração no fundo das UEs resultante da última alimentação.

Biofoco (BFT)

O BFT utilizado durante o experimento era coletado de um tanque de produção de camarões localizado na Estação Marinha de Aquicultura – EMA/IO-FURG com o auxílio de baldes de 20 litros. Os ciclos de renovação de água das UEs eram realizados à cada 72 horas, com a substituição de aproximadamente 90% do volume das UEs, mantendo desta forma, as mesmas características do biofoco em todas as UEs durante o experimento.

Meio de Cultivo de Ciliados e Nematódeos (MCCN)

Para a produção massiva de nematódeos aplicou-se a técnica desenvolvida por Loureiro et al. (em preparação), em tanques de fibra de vidro com volume útil de 50 litros, água marinha filtrada em filtro de areia e posteriormente por filtros cartucho (Cuno - 5 µm). Os tanques foram equipados com sistema de aeração e aquecimento de água para manter o sistema com temperatura próxima à 38° C.

Com a água na temperatura desejada foram adicionados: 50mL L⁻¹ de MCCN em produção (inóculo de microorganismos), 50 mL L⁻¹ de melação de cana-de-açúcar e 3gr L⁻¹ de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As quantidades descritas para melação e levedura foram divididas em 2 aplicações com intervalo de 48 horas. Na segunda aplicação, adicionou-se também: 300gr L⁻¹ de feno de alfafa, 0,2 gr L⁻¹ de ácido ascórbico e 4mL L⁻¹ óleo de pescado.

Nematódeos

Para a obtenção dos nematódeos fornecidos como complemento alimentar durante o experimento, filtrava-se o MCCN maturado (após aproximadamente 10 - 12 dias) utilizando um conjunto de separação com 3 diferentes tamanhos de malha. Nos 2 primeiros filtros utilizou-se tamanho de malha igual à 1 mm e 500 µm para a retirada dos fragmentos de alfafa e outras impurezas. O terceiro tamanho de malha, igual à 300 µm, reteve as formas adultas

dos nematódeos produzidas. Os animais separados eram concentrados em Beckers (2 litros) com água marinha para posterior quantificação.

Quantificação dos nematódeos e enriquecimento do biofoco

Após a concentração dos nematódeos, realizava-se a quantificação da solução estoque, bem como, dos nematódeos que colonizavam originalmente o biofoco utilizando um microscópio óptico invertido Axiovert 135 (ZEISS) com magnificação de 100X.

As amostras eram coradas com solução de Lugol à 2% e colocadas em câmaras de sedimentação (UTERMÖHL) de 2,1 mL (Thronsen, 1978). Passados aproximadamente 5 minutos para precipitação dos organismos iniciava-se a quantificação. A contagem de duas faixas utilizando a objetiva citada anteriormente, era o suficiente para garantir a contagem mínima de 100 indivíduos por amostra. Para a determinação do volume de nematódeos necessário para enriquecer o BFT nas concentrações pré-estabelecidas para cada tratamento, utilizava-se o fator de diluição ($C_1V_1 = C_2V_2$).

Análise dos microrganismos

Para analisar os microrganismos durante o cultivo, amostras de água das UEs foram coletadas logo após o inóculo dos nematódeos e uma segunda amostragem era realizada após 72 horas, momentos antes da realização da renovação da água do cultivo com biofoco.

Para estas análises foram selecionados 3 fases durante o estudo: a) *fase inicial* corresponde às amostras coletadas nos dias 29/03/10 e 01/04/2010; b) *fase intermediária* corresponde às amostras coletadas nos dias 05/04/10 e 08/04/2010; c) *fase final* corresponde às amostras coletadas nos dias 12/04/10 e 15/04/2010.

Análise do conteúdo estomacal

Estas análises foram realizadas em 3 camarões coletados nas três fases de cultivo.

Utilizando bisturi e agulhas de dissecação o compartimento estomacal dos camarões era extraído e colocado sobre lamina. Um corte transversal era realizado para obter a porção anterior deste órgão.

A parte anterior do estômago era corado (solução de Lugol - 2%) e o conteúdo extravasado entre lâmina e lamínula para análise qualitativa sob um microscópio óptico Axiovert 135 (ZEISS), nos aumentos de 100X, 200X e 400X.

Análise da qualidade de água

Oxigênio dissolvido, Amônia – NAT, Temperatura e pH

Um sensor da marca YSI™ mod. 556 foi utilizado para realizar as medidas diárias de temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido. O oxigênio dissolvido e temperatura foram analisados duas vezes ao dia, nas primeiras horas da manhã e ao final da tarde (8 e 18 horas), o pH foi analisado diariamente no início da manhã.

A concentração da amônia total foi determinada à cada 72 horas, sempre nas primeiras horas do dia e antes de cada ciclo de renovação, utilizando o método proposto por UNESCO (1983).

Sólidos sedimentáveis

Este parâmetro foi determinado ao final de cada ciclo de renovação, o cone Imhoff foi utilizado para determinar o volume do material em suspensão acumulado no fundo do cone após 15 minutos após a amostragem (Avnimelech 2007).

Análise estatística

Os dados relacionados ao peso final dos camarões, sobrevivência, oxigênio dissolvido, temperatura da água e amônia - NAT foram submetidos à análise de variância - ANOVA (Zar,

1999). Quando detectadas diferenças significativas ($P < 0,05$) o teste Tukey foi aplicado (Zar, 1999).

Os dados referentes à abundância das populações de microrganismos durante o experimento foram submetidos ao teste-t pareado, para determinar as diferenças significativas entre as populações inicial e final em cada tratamento nas fases: inicial, intermediária e final de cultivo (Zar, 1999).

Resultados

Os valores do oxigênio dissolvido medidos durante o experimento indicam o comportamento similar deste parâmetro entre os tratamentos. Já a concentração de amônia – NAT medida durante o cultivo apontou diferença significativa entre os tratamentos, com as maiores concentrações (média \pm dp) nos tratamentos BF, N1 e N5. No tratamento N10 a concentração de amônia permaneceu próxima à zero durante o estudo. Os valores medidos de temperatura, salinidade, pH e sólidos sedimentáveis não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos durante o todo o experimento, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de qualidade de água durante o cultivo nos tratamentos BF, N1, N5 e N10. Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças significativas entre as médias.

Parâmetros hidrobiológicos	Tratamentos			
	BF	N1	N5	N10
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,86 \pm 0,35	5,98 \pm 0,44	6,23 \pm 0,4	5,97 \pm 0,47
Amônia - NAT (mg/L)	0,71 \pm 0,12 ^a	0,43 \pm 0,10 ^b	0,26 \pm 0,06 ^c	0,04 \pm 0,11 ^d
Temperatura (°C)	26,07 \pm 0,47	25,77 \pm 0,43	25,97 \pm 0,6	26 \pm 0,6
Salinidade (‰)	33	33	33	33

pH	8,3 ± 0,27	8,29 ± 0,21	8,38 ± 0,17	8,4 ± 0,2
Sólidos sedimentáveis (mg/L)	8,2 ± 3,9	9,5 ± 4,3	10 ± 0,2	9,27 ± 5,53

O peso final dos camarões cultivados nos tratamentos N1, N5 e N10 foram significativamente maiores ($0,15 \pm 0,02$ g; $0,14 \pm 0,02$ g; $0,13 \pm 0,03$ g respectivamente) do que o peso final obtido pelos camarões cultivados no tratamento controle BF ($0,09 \pm 0,03$ g), como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Índices zootécnicos finais ($Md \pm Dp$) das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* submetidos aos tratamentos BFT, BFT 10, BFT 100 e BFT 1000. Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

	Bf	N1	N5	N10
Peso final	$0,09 \pm 0,03^a$	$0,15 \pm 0,02^b$	$0,14 \pm 0,02^b$	$0,13 \pm 0,03^b$
Sobrevivência	$39 \pm 9,8^b$	$61 \pm 29,6^b$	$95 \pm 4,6^a$	$64 \pm 12,7^b$

Ao final do experimento os camarões cultivados no tratamento N5 apresentaram maior índice de sobrevivência (94 ± 5 %). Comparados aos camarões cultivados nos tratamentos BF, N1 e N10, que apresentaram valores de 39 ± 10 %, 61 ± 29 % e 64 ± 13 % respectivamente (tabela 2).

A abundância de flagelados e ciliados apresentou aumento significativo nas 3 fases analisadas (29/3, 5/4 e 12/4), principalmente nos tratamentos (BF e N1) como observado nas figuras 1, 2 e 3.

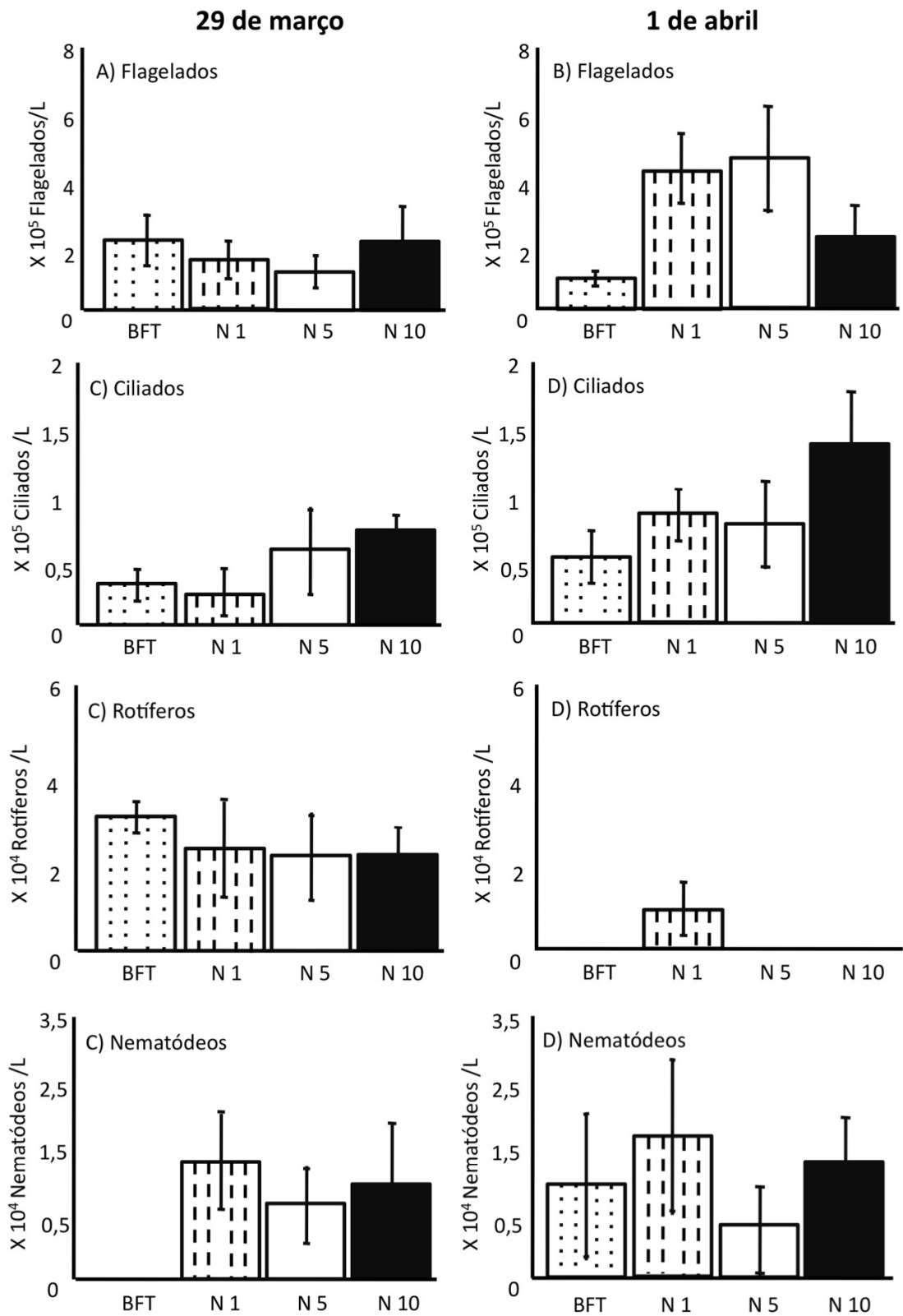


Figura 1: Abundância de flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos na fase inicial de cultivo que teve início no dia 29/3 e término em 1/4. A letra *a* sobrescrita indica diferença significativa entre as populações inicial e final ($p < 0,05$).

Os rotíferos sofreram significativa redução em todas as fases de cultivo (29/3, 5/4 e 12/4), porém, no tratamento BF este resultado foi mais contundente, especialmente na fase inicial de cultivo, que corresponde ao dia 29/3 como mostrado na figura 3.

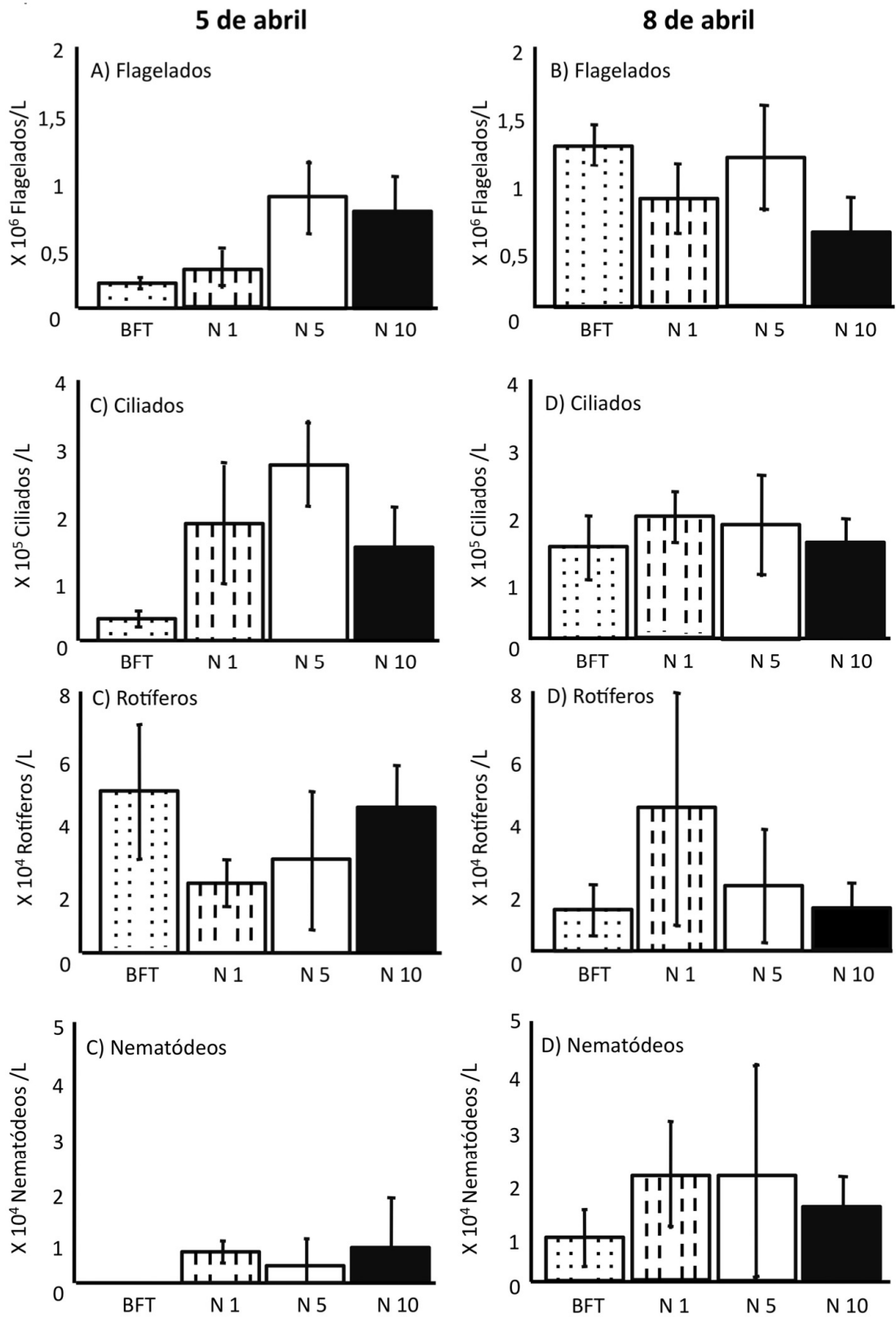


Figura 2: Abundância de flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos na fase inicial de cultivo que teve início no dia 5/4 e término em 8/4. A letra a sobrescrita indica diferença significativa entre as populações inicial e final ($p < 0,05$).

A abundância de nematódeos durante este estudo permaneceu praticamente estável durante as fases analisadas (29/3, 5/4 e 12/4) em quase todos os tratamentos, como observado nas figuras 3, 4 e 5.

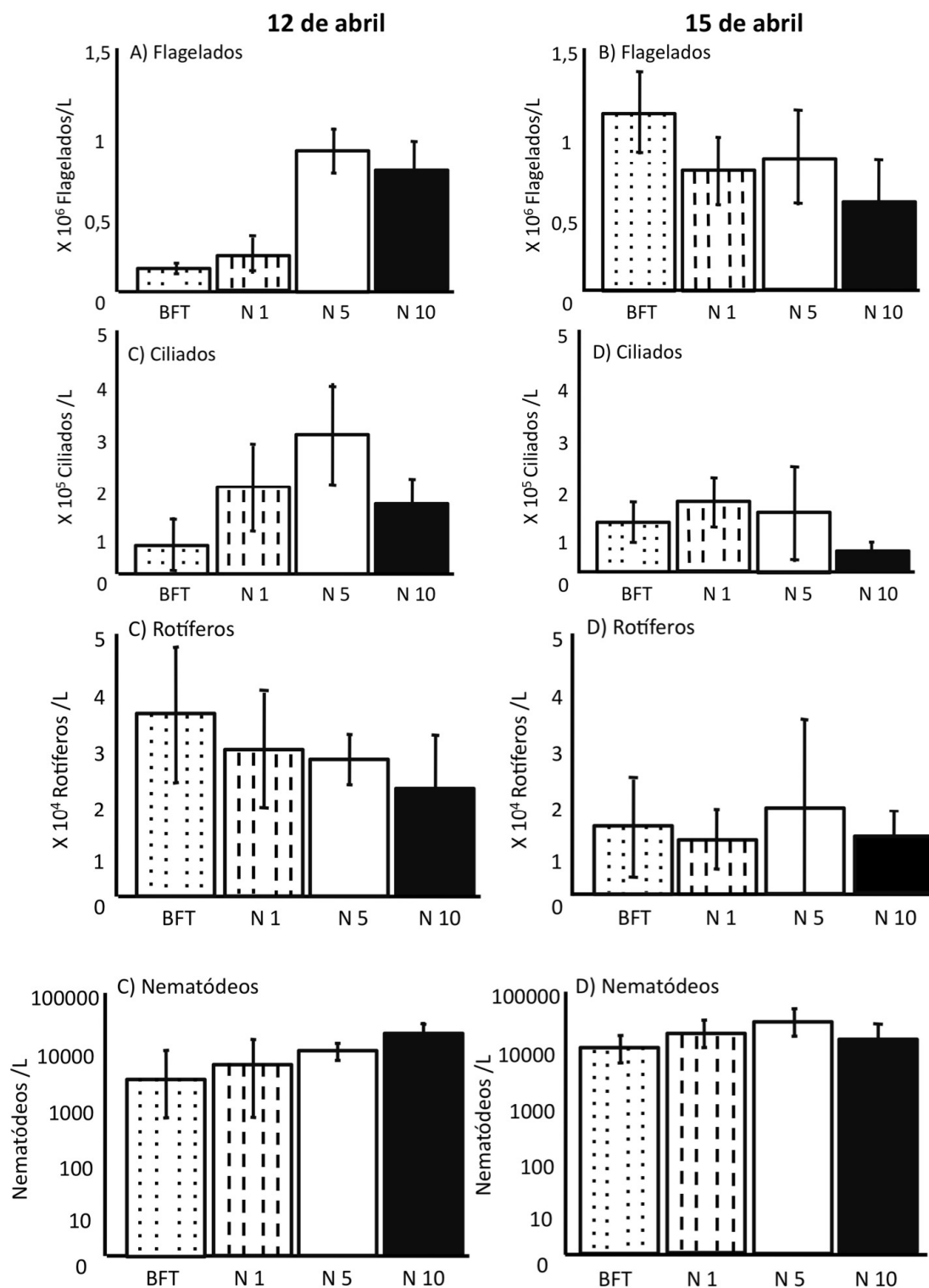


Figura 3: Abundância de flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos na fase inicial de cultivo que teve início no dia 12/4 e término em 15/4. A letra a sobrescrita indica diferença significativa entre as populações inicial e final ($p < 0,05$).

A tabela 3 mostra na íntegra dos resultados obtidos com a quantificação dos flagelados, ciliados, rotíferos e nematódeos ($MD \pm DP$) nas diferentes fases de cultivo.

Análise do conteúdo estomacal

Durante as análises foi observada a presença de ciliados, rotíferos e nematódeos no estômago das pós-larvas cultivadas nos tratamentos N5 e N10, coletadas na fase final de cultivo. Flagelados não foram avistados nas amostras, provavelmente pela fragilidade da estrutura destes organismos, perante os processos digestivos dos camarões.

Tabela 3: Abundância das diferentes classes de microrganismos (org./L) ao início e final dos tempos 29/3, 5/4 e 12/4. A letra a indica diferença significativa entre as populações inicial e final.

	BF		N1		N5		N10	
	Abundância Inicial	Abundância Final	Abundância Inicial	Abundância Final	Abundância Inicial	Abundância Final	Abundância Inicial	Abundância Final
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
27.mar								
flagelados	218745 ± 76982	92359 ± 22169,5 ^a	166084,1 ± 51573,9	422907 ± 89737,7 ^a	127196,1 ± 64445,7	461795 ± 173667,7 ^a	205782,3 ± 49540,9	216314,5 ± 67057,1
ciliados	30786,3 ± 11365,5	51040,5 ± 16195,2	27545,6 ± 20315,6	70484,5 ± 15600,7 ^a	53471 ± 29488,3	63193 ± 28344,3	62382,8 ± 17232,0	146640,1 ± 32158,6 ^a
rotíferos	30786,3 ± 5887,0	zero ^a	25115,1 ± 12830,3	9722 ± 4347,8	22684,6 ± 12168,7	zero ^a	22684,6 ± 7318,5	zero ^a
nematódeos	zero	9722 ± 9223,1 ^a	12152,5 ± 6700,4	16203,3 ± 10501,0	7291,5 ± 4067,0	4050,8 ± 4779,3	10532,1 ± 7155,2	12962,6 ± 5020,4
05.abr								
flagelados	211453,5 ± 45262,1	1251707,5 ± 145789,5 ^a	305432,8 ± 129832,1	862827,5 ± 242402,6 ^a	849864,8 ± 329063,7	1160158,6 ± 356873,8	738872 ± 294032,2	728339,8 ± 241771,4
ciliados	30786,3 ± 11773,9	149070,6 ± 51413,4 ^a	193629,8 ± 79543,3	201731,5 ± 64543,4	298141,3 ± 81378,8	192819,6 ± 83895,1	146640,1 ± 64225,3	163653,6 ± 25289,7
rotíferos	48610 ± 23006,5	16203,3 ± 7937,9 ^a	25115,1 ± 7155,1	43749 ± 34918,1	29976,1 ± 20718,7	21874,5 ± 16768,7	44559,1 ± 16097,7	15393,1 ± 7155,2 ^a
nematódeos	zero	10532,1 ± 6461,0 ^a	6481,3 ± 2510,2	21874,5 ± 11807,3 ^a	4050,8 ± 4779,3	21874,5 ± 21901,5	11342,3 ± 9558,6	15393,1 ± 6461,0
12.abr								
flagelados	274646,5 ± 40757,1	1178792,5 ± 207849,7 ^a	303812,5 ± 80917,8	827990,3 ± 160182,1 ^a	849864,8 ± 141066,7	848244,5 ± 221924,7	738872 ± 167715,1	605194,5 ± 211433,9
ciliados	77776 ± 74991,9	130436,8 ± 207849,7	186338,3 ± 68722,0	166894,3 ± 55053,2	298141,3 ± 119096,2	149070,6 ± 110961,5	135297,8 ± 48553,3	63193 ± 17117,3 ^a
rotíferos	36457,5 ± 11807,3	16203,3 ± 10941,8 ^a	30786,3 ± 10501,0	12152,5 ± 5953,5 ^a	29976,1 ± 6461,0	17823,6 ± 17300,4	22684,6 ± 14310,4	12152,5 ± 5098,3
nematódeos	4050,8 ± 3659,2	9722 ± 6874,5	6481,3 ± 5020,4	17013,5 ± 11400,1	8101,6 ± 2510,2	20254,1 ± 11261,0	14583 ± 8695,6	12152,5 ± 4067,0

Discussão

A utilização de nematódeos *Panagrellus redivivus* como alimento para algumas espécies de interesse para a aquicultura tem sido testado com sucesso. As espécies testadas foram os camarões *Crangon crangon*, *Penaeus blebejus* e *Litopenaeus vannamei*, bem como, o catfish *Synodontis petricola* e as carpas comum *Cyprinus carpio* e prateada *Hypophthalmichthys molitrix* (Delbare & Dhert, 1996; Focken *et al.* 2006; Jürgen *et al.* 2007)

Análises bioquímicas dos nematódeos mostraram que o peso seco é formado por aproximadamente 48,3% de proteína, 17,3 % de lipídios e 31,3 % de carboidratos (Biedenbach *et al.* 1989). Contudo, substratos com maiores níveis de nitrogênio disponível na matéria orgânica resultam em populações de nematódeos com ainda maior valor protéico (Findlay, 1982).

Nos tratamentos N1, N5 e N10 onde os nematódeos foram adicionados ao sistema BFT, o peso final (md \pm dp) dos camarões foi significativamente maior (0,15; 0,14 e 0,13 g respectivamente) quando comparados ao tratamento controle BF (0,09 g). As contagens de nematódeos durante o experimento (tabela 3), não apontaram diferença significativa na abundância desta classe de microorganismos entre os tratamentos. Mas considerando a diferença significativa observada entre o peso final dos camarões cultivados no tratamento controle e os demais tratamentos, acredita-se que a adição de *Rhabditis* sp. ao sistema BFT,

tenha sido fator preponderante para o maior peso final dos camarões nos tratamentos N1, N5 e N10. Estes resultados sugerem a efetividade destes organismos quando utilizados como elemento enriquecedor do valor nutricional do flocó microbiano produzido pelo sistema BFT.

O enriquecimento do sistema BFT com 1000 nematódeos L⁻¹ (N1), levou a um incremento significativo do peso final dos camarões cultivados neste tratamento (0,15 ± 0,02 g), apresentando praticamente o dobro do peso final obtido pelos camarões cultivados no tratamento controle BF (0,09 ± 0,03 g). Por outro lado, os camarões cultivados no tratamento N5 apresentaram o melhor índice (md ± dp) de sobrevivência (94 ± 5 %) diferenciando estatisticamente dos tratamentos BF (39 ± 10 %), N1 (61 ± 29 %) e N10 (64 ± 13 %). Cruzando os valores obtidos no tratamento N5 para peso final (0,14 g) e sobrevivência (94 ± 5 %), este tratamento destaca-se dos demais. Desta forma a concentração de nematódeos aplicada no tratamento N5 (5000 nematódeos L⁻¹) apresentou os melhores resultados zootécnicos para o camarão *L. vannamei*, melhorando as condições para seu crescimento no sistema BFT, que já apresenta excelentes resultados para cultivo super-intensivo deste crustáceo.

Os dados referentes à qualidade de água reunidos na tabela 1, mostram uma redução significativa dos níveis da amônia total – NAT nos tratamentos: N1, N5 e N10 (0,43 ± 0,10; 0,26 ± 0,06 e 0,04 ± 0,11 mg L⁻¹ respectivamente) quando comparados com o tratamento controle BF (0,71 ± 0,12 mg L⁻¹).

O melaço de cana-de-açúcar adicionado ao meio de cultivo de nematódeos para manutenção deste sistema, era carregado às unidades experimentais em decorrência da adição de nematódeos. Segundo Avnimelech (1999, 2006) a consequência da adição de carboidratos em sistemas de cultivo é a redução dos níveis de amônia e outras formas de nitrogênio inorgânico dissolvido, devido à multiplicação das bactérias heterotróficas, tornando o ambiente de cultivo mais favorável para os organismos cultivados e menos impactante ao meio ambiente.

Sabe-se que bactérias e outros microorganismos utilizam carboidratos (açúcares, amido e celulose) como alimento, gerando energia para o crescimento celular, através da imobilização do carbono e nitrogênio dissolvidos na coluna de água, realizando desta maneira a síntese de proteína microbiana (Avnimelech 2009), e tornando os nutrientes disponíveis para seus predadores (Pomeroy 1974; Azam *et al.* 1983).

Os nematódeos da espécie *Rhabditis* sp. são organismos bacteriófagos, oportunistas e de alta fecundidade, além de possuírem ciclo de reprodução curto que varia de 5 – 7 dias (Warwick, 1987; Delbare & Dhert, 1996). Devido ao provável aumento da biomassa bacteriana no sistema BFT em decorrência da adição de nematódeos ao sistema de cultivo, a classe dos nematódeos não sofreu redução em sua abundância durante todo o cultivo. Porém, análises do conteúdo estomacal dos camarões puderam comprovar que os nematódeos fizeram parte da dieta dos camarões. Avnimelech (2006) afirma que da porção diária de

nitrogênio assimilada pelos camarões, aproximadamente 18 – 29 % é de origem microbiana.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a hipótese de que o enriquecimento do biofloco com nematódeos produzidos pelo MCCN incrementa o crescimento dos camarões cultivados

Referências Bibliográficas

- Avnimelech, Y. (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 174:227-235.
- Avnimelech, Y. (2006) Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. *Aquacult. Eng.* **34**, 172-178.
- Avnimelech, Y. (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264: 140-147.
- Avnimelech, Y. (2009) Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. & Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, p. 257-263.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., Abreu, L. & Wasielesky, W. (2010) Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), p.163-172.
- Biedenbach, J.M., Smith, L.L., Thomsen, T.K., Lawrence, A. (1989) Use of the Nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *Journal World Aquaculture Society*, **20**: 61-71.
- Delbare, D. & Dhert, P. (1996) Cladocerans, Nematodes and Trochophora larvae In: Lavens, P; Sorgeloos, P. (eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper. No. 361.

- Rome, FAO. 1996. 295p.
- Findlay, S. E. G. (1982) Effect of detrital nutritional quality on population dynamic of a marine nematode (*Dipbbimella chitwoodi*). *Mar. Biol.* **68**: 223-227.
- Focken, U., Schlechtriem, C., Garc, A., Puello-Cruz, A., Becker, K. (2006) *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquac. Res.*, **37**, p. 1429-1436.
- Hall, M., McKinnon, D., Horne, M., Southgate, P. (JCU), Duggan, S., Steffens, A., Salmon, M. & Kenway, M. (2004) Live and formulated feeds: challenges, capabilities and research at the Australian Institute of Marine Science *In: The Second Hatchery Feeds and Technology Workshop, Sydney, September 30 - October 1*
- Izquierdo, M. S. (2004) Nutritional requirements for finfish larvae *In: The Second Hatchery Feeds and Technology Workshop, Sydney, September 30 - October 1*
- Jürgen S., Kaiser H., Focken U., Becker K. (2007) *Panagrellus redivivus* (Linné) as a live food organism in the early rearing of the catfish *Synodontis petricola* (Matthes).” *Aquaculture Research* **38**: p. 653-659.
- Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1996) *Manual on the production and use of live food for aquaculture - FAO Fisheries Technical Paper. n° 361*, Rome: FAO.
- Loureiro, C. K. (2006) *Sucessão microbiana na degradação de substratos orgânicos associados às leveduras (Sacharomyces cerevisiae): Potencial para utilização na Aqüicultura?* Tese de mestrado, 39 p. Universidade

Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Martinez-Cordova, L.R. (2002) Camaronicultura, avances y tendências. México, AGT Editor S.A. 167p.

Pomeroy, L. R. (1974) The Ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, **24**, p. 499-504.

Schlechtriem, C., Ricci, M., Focken, U., Becker, K. (2002) A New Technology for the Mass Production of the Free-Living Nematode *Panagrellus Redivivus*, an Alternative Live Food for First- Feeding Fish Larvae: A Contribution to the Improvement of Sustainable Seed Supply for Aquaculture . *Journal Of The World Aquaculture Society*.

Silva, F., Ballester, E., Monserrat, J., Geracitano, L., Wasielesky, W., Abreu, P.C. (2008) Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition*, **14** (6), p. 507-514.

Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, **200** (1-2), p.147-159

Thronsen, J., (1978) Preservation and storage. In: Sournia, A. Phytoplankton Manual. Paris Unesco, Chap. 4: p. 69-74.

Unesco, (1983) Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commissiony. Paris, France.

Utermöhl, H., (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton metthodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol* **9**, p. 1-38.

Warwick, R. M. (1987) Meiofauna: Their role in marine detrital systems. In: Moryarti, D. J. W.; Pullin, R. S. V. (Eds.) Detritus and microbial ecology in aquaculture. (Proceedings of the Conference on Detrital Systems for Aquaculture). Bellagio: ICLARM, 282-290p.

Watanabe T. & Kiron, V. (1994) Review prospects in larval nutrition. *Aquaculture* **124**, p. 223-251.

Zar, J.H. (1999) Bioestatistical analysis. 4th.ed. New Jersey: Prentice-Hall, pp. . 660p.

Discussão Geral

As estratégias para manipulação das comunidades de microorganismos em viveiros de cultivo, podem ser agrupadas em 3 categorias: a) suplementadores nutricionais e/ou controladores, b) expansão de habitats e c) microorganismos cultivados (Browdy et al. 2001).

A comunidade microbiana presente em sistemas de cultivo com troca de água reduzida, além de servir como suplemento nutricional, mantém a qualidade de água e controla o acúmulo de resíduos nestes sistemas.

Os organismos aquáticos assimilam aproximadamente 20-30% dos nutrientes adicionados aos sistemas de cultivo na forma de alimento formulado. Para a preservação da saúde animal, é de suma importância que estes nutrientes sejam removidos. Os microorganismos são capazes de purificar o meio de cultivo de maneira mais eficiente, que a geração destes metabólitos, tornando-os novamente disponíveis na cadeia trófica dos viveiros.

A abundância dos microorganismos varia de acordo com as condições do ambiente de cultivo, desta forma, a produção de microorganismos em laboratório, seria uma importante ferramenta para auxiliar na manutenção das comunidades benéficas aos sistemas com troca de água reduzida.

Estes resultados indicam a importância da adição de ciliados e nematódeos no sistema BFT, com a utilização do MCCN estes microorganismos são produzidos massivamente utilizando ingredientes de baixo custo, podendo enriquecer a comunidade de microorganismos no biofoco. Contudo, estudos ainda devem ser realizados para melhorar os

índices de sobrevivência dos camarões cultivados no sistema BFT enriquecido com ciliados e nematódeos produzidos no MCCN, bem como, para melhorar o entendimento das interações entre os microorganismos obtidos pelo MCCN adicionados ao sistema BFT e o biofloco

Os estudos apresentados nesta tese, apontam os primeiros resultados obtidos com a suplementação do sistema BFT, com microorganismos produzidos em laboratório como alimento vivo complementar para camarões cultivados.

Conclusão Geral

Os resultados obtidos durante estes estudos indicam que o consumo de protozoários e nematódeos pelos camarões, está fortemente relacionado com o crescimento destes crustáceos, ou seja, com a relação de tamanho entre presa e predador. Pois observou-se que ciliados e rotíferos foram consumidos nas fases inicial e intermediária de cultivo, já os nematódeos foram consumidos em todas as fases analisadas, apontando sua importância como alimento vivo para a aquicultura. O enriquecimento do sistema BFT com protozoários e nematódeos produzidos pelo MCCN, pode contribuir para a melhora dos índices zootécnicos obtidos pelos camarões cultivados, bem como, para auxiliar na manutenção da qualidade de água de cultivo.

Perspectivas de Futuros Estudos

Estudos deverão ser realizados objetivando: a) aumento na produção de protozoários e nematódeos, b) formas de estocagem dos microorganismos

produzidos pelo MCCN, c) determinação do valor nutricional de ciliados e nematódeos d) utilização de flagelados, ciliados e nematódeos para produção de organismos com potencial para utilização como alimento vivo na aquicultura; como exemplo pode-se citar o poliqueta *Laeonereis acuta*, por se tratar de uma presa natural de camarões e ser densamente encontrada em estuários na Argentina, Uruguai e no sul do Brasil (Orensanz & Gianuca 1974, Bemvenuti, 1998, Omena & Amaral 2000).

Referências Bibliográficas da Discussão Geral

- Bemvenuti, C.E., 1998. Invertebrados Bentônicos. In: Seeliger, U., Odebrecht, C. & Castello, J.P. (Ed.). Os Ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. *Ecocientia*: 46-51.
- Browdy, C. L., Bratvold, D., Stokes, A. D., McIntosh, P., 2001. Perspectives on the Application of Closed Shrimp Culture Systmes. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA.
- Omena, E.P. & Amaral, A.C.Z., 2000. Population dynamics and secondary production of *Laeonereis acuta* (Treadwell, 1923) (Nereididae: Polychaeta). *Bull. Mar. Sci.*, 67(1): 421-431.
- Orensanz, J.M. & Gianuca, N.M., 1974. Contribuição ao conhecimento dos anelídeos poliquetas do Rio Grande do Sul, Brasil. *Com. Mus. Ciên. PUCRS*, 4:1-37.

