

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO LARVAL DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADO COM O COPÉPODO BENTÔNICO
*Tisbe biminiensis***

LILIAN CRISTINE MARINHO DE LIMA

RECIFE
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LILIAN CRISTINE MARINHO DE LIMA

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO LARVAL DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADO COM O COPÉPODO BENTÔNICO
*Tisbe biminiensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador:

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

RECIFE
2007

Lima, Lilian Cristine Marinho de

Sobrevivência e crescimento larval do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* alimentado com o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* / Lilian Cristine Marinho de Lima. – Recife: O Autor, 2007.

70 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Camarão 2. Larvicultura 3. *Litopenaeus vannamei* 4. Copépodo I. Título.

595.384.1 CDU (2.ed.)

UFPE

595.388 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-077

LILIAN CRISTINE MARINHO DE LIMA

**SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO LARVAL DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADO COM O COPÉPODO BENTÔNICO
*Tisbe biminiensis***

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

Examinadores:



Prof. Dra. Lilia Pereira de Souza Santos



Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez



Prof. Dr. Eudes de Souza Correia



Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Suplentes:



Prof. Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos

Dra. Mariana Guenther

RECIFE
2007

Aos meus pais, minha tia-avó, minha irmã e meu marido.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela conclusão do mestrado em Biologia Animal;

Aos meus pais Oberlam Macêdo de Lima e Lenira Marinho de Lima, minha tia-avó Djanira Maria Bezerra, minha irmã Lenirlam Marinho de Lima e ao meu noivo João de Azevedo Neto, pelo apoio na realização do mestrado;

À Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos, pelo incentivo, a amizade e a orientação;

À empresa Aqualider em nome do diretor Manuel Tavares, do gerente Jeovani, dos técnicos Lucas e Severino Touro, da secretária Ana Cristina e todos os funcionários pelo apoio;

Ao Prof. Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco pelas sugestões;

À minha amiga irmã MSc. Tarcila Nadia, pelo apoio e as sugestões;

A Profa. Dra. Mônica Costa da Universidade Federal de Pernambuco e Msc. Priscila Moura pelas sugestões e a correção do manuscrito em inglês;

Ao Prof. Dr. Manuel Flores do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco pela realização das análises de amônia e pesagem do material;

À Profa. Dra. Maria de Eduarda Lacerda de Larrazábal pelo apoio e a orientação no estágio à docência;

Ao Prof. Dr. Eudes Correia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Dra. Anita Valença pelo envio de alguns artigos;

À minha amiga Msc. Aurelyanna Ribeiro pelas sugestões e apoio;

Aos amigos Sérgio, Thiago e Valdelira pela ajuda e incentivo durante os momentos de aflição;

À Msc. Cristiane Castro, ao biólogo Rodolfo Araújo, as estagiárias Deloar e Gaby pelo auxílio;

Ao Msc. Marcio Santana e ao técnico Joaquim do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio e incentivo;

À bióloga Iara pela ajuda na análise da amônia;

Aos amigos Adilma, Sérgio, Tarcila, Thiago, Aurelyanna, Rodolfo, Alzira, Daniela, Renata, Tatiana e Cristiane nos momentos alegres compartilhados;

Aos professores e funcionários do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos e apoio;

Aos professores e funcionários do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio e a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Fig 1. Daily ingestion rate of *L. vannamei* larvae during stages mysis 3 (A), postlarva 1 (B), 3 (C), 5 (D) and 7 (E) fed on different copepod *T. biminiensis* offspring concentrations, in experiments using flat bottom flasks without aeration. Equal letters indicate that ingestion rates did not differ significantly (ANOVA and Tukey, $p > 0.05$). *T. biminiensis* nauplii (■) and copepodites (□) and *Artemia* nauplii (⊙) consumed. n = number of replicates..... 25

Fig 2. Daily ingestion rate of *L. vannamei* larvae during stages mysis 2 (A) and 3 (B) fed on different copepod *T. biminiensis* offspring concentrations, in experiments using conic bottom flasks with aeration. Equal letters indicate that ingestion rates do not differ significantly (ANOVA or Kruskal-Wallis and Tukey test $p > 0.05$). *T. biminiensis* nauplii (■) and copepodites (□) and *Artemia* nauplii (⊙) consumed. n = number of replicates..... 29

Fig 3. Variation of daily ingestion rate (number of prey.larva⁻¹.day⁻¹) of *L. vannamei* fed on copepod *Tisbe biminiensis* offspring (●) and on *Artemia* nauplii (□) as a function of larval development..... 30

Capítulo III

Figura 4. Concentração de amônia (NH₄⁺) nos cultivos das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. durante o período de incubação no primeiro teste de desempenho..... 41

Figura 5. Porcentagem de sobrevivência das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no primeiro teste de desempenho estimada a partir do dia 2º dia de cultivo (n=150 larvas)..... 42

- Figura 6.** Variação do comprimento (mm) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios inicial de misis 1 (□, n= 29) e final de pós-larva 8 (■) em função dos tratamentos com 50% (T1) (n= 241) e 100% (T2) (n=116) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. (n=172) no primeiro teste de desempenho..... 43
- Figura 7.** Variação do peso seco (µg) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios inicial de misis 1 (□, n= 2) e final de pós-larva 8 (■) em função dos tratamentos com 50% (T1) (n= 4) e 100% (T2) (n=3) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. (n=4) no primeiro teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey..... 44
- Figura 8.** Relação entre o tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o comprimento nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no primeiro teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de misis 1..... 45
- Figura 9.** Concentração de amônia nos cultivos das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados durante o período de incubação no segundo teste de desempenho..... 46
- Figura 10.** Concentração de oxigênio (ml l⁻¹) durante o período de incubação das larvas de *Litopenaeus vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1)(▲) e 100% (T2)(◆) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle (■) com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados no segundo teste de desempenho..... 47
- Figura 11.** Porcentagem de sobrevivência das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey..... 48

- Figura 12.** Variação do comprimento (mm) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios de pós-larva 2 (□, n= 80) e pós-larva 9 (■) em função do tratamento com 50% (T1) (n=107) e 100% (T2) (n=117) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados (n=61) no segundo teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey..... 49
- Figura 13.** Variação do peso seco (µg) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios de pós-larva 2 (□, n= 2) e pós-larva 9 (■) em função do tratamento com 50% (T1) (n=2) e 100% (T2) (n=5) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados (n=2) no segundo teste de desempenho..... 50
- Figura 14.** Relação entre o tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o comprimento nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de pós-larva 2..... 51
- Figura 15.** Relação entre o ln do tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o ln peso seco nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de pós-larva 2..... 52

LISTA DAS TABELAS

Capítulo II

Table 1. Food concentration and the proportion of nauplius in the offspring offered to shrimp <i>L. vannamei</i> at different larval stages in experiments using flat bottom flasks without aeration and conic bottom flasks with aeration.....	22
--	----

Capítulo III

Tabela 2. Resultado da análise de regressão entre o tempo de desenvolvimento em dias e comprimento (mm) no primeiro teste de desempenho.....	44
Tabela 3. Média da temperatura, salinidade e pH durante o período experimental no segundo teste de desempenho.....	46
Tabela 4. Resultado da análise de regressão entre o tempo de desenvolvimento em dias e o comprimento (mm) e ln do tempo de desenvolvimento em dias e o ln do peso seco (μg) no segundo teste de desempenho.....	50

RESUMO

A produção dos cistos de *Artemia* sp. nem sempre atende a demanda das aqüiculturas. Deste modo, dietas alternativas precisam ser testadas. Os objetivos desse trabalho foram em primeiro lugar estimar o efeito de diferentes concentrações da prole do copépodo *Tisbe biminiensis* na taxa de ingestão das larvas de *Litopenaeus vannamei* e estimar a concentração ótima desta prole para alimentar estas larvas. Em segundo lugar foram comparados a sobrevivência e o crescimento das larvas de *L. vannamei* nutridas com a prole do copépodo *Tisbe biminiensis* e com os náuplios de *Artemia*. Os experimentos foram realizados com água do mar na salinidade 31-33, temperatura de 25-30°C e fotoperíodo de 13h luz/11 h escuro. Nos experimentos de taxa de ingestão, larvas nos estágios de misis (M) 2 e 3 e pós-larvas (PL) 1, 3, 5 e 7 foram consideradas. Quatro diferentes concentrações da prole do copépodo foram testadas para cada estágio como também controles sem larvas. Além disso, controles com náuplios de *Artemia* também foram usados para avaliar o estado fisiológico das larvas testadas. Dois testes de desempenho foram realizados, no primeiro larvas no estágio M 1 foram cultivadas em frascos com fundo cônicos com aeração contendo de 5 l de água e a densidade inicial de 60 l⁻¹. No segundo teste, as larvas no estágio de PL 2 foram cultivadas em frascos com fundo plano com aeração contendo 1 l de água e densidade inicial de 65 l⁻¹. O nível de substituição de náuplios de *Artemia* pela prole do copépodo foi: 0% (controle), 50% (T1) e 100% (T2). Nos experimentos de taxa de ingestão, a melhor concentração de prole de copépodo foi 5 copépodo ml⁻¹ para M 2 e 3. Nos estágios de pós-larva, a melhor concentração de copépodo foi cerca de 10 copépodo ml⁻¹ para PL 1 a 3 e 20 copépodo ml⁻¹ para PL 5 a 7. No primeiro teste de desempenho, a sobrevivência não foi significativamente diferente entre os tratamentos, embora tenha ocorrido alta mortalidade nas primeiras 24 h. No segundo teste, a sobrevivência não foi significativamente diferente em T2 e T1, mas foi significativamente menor no controle. O crescimento das larvas não foi significativamente diferente entre os tratamentos em ambos os testes. Deste modo, conclui-se que a prole de *T. biminiensis* copépodo é um alimento potencial para ser usado na larvicultura de *L. vannamei* embora mais testes de desempenho devam ser realizados.

Palavras chave: camarão, larvicultura, *Litopenaeus vannamei*, copépodo

ABSTRACT

The production of *Artemia* cysts not always reaches the increasing demand of aquaculture. Thus, alternative diets need to be tested. The first objective was to investigate the effect of different concentration of *Tisbe biminiensis* copepod offspring in the ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae and to estimate the best concentration to feed them. The second objective was to evaluate the survival and growth of larvae fed on *Tisbe biminiensis* copepod offspring in comparison to those fed on *Artemia* sp. The experiments conditions were seawater of salinity 31-33 were at 25-30°C and at the photoperiod of 13h light/11 h dark. The ingestion rate experiment tested larvae in the mysis (M) 2 and 3 stages and postlarvae (PL) 1, 3, 5 and 7. Four copepod offspring concentrations were tested as well as controls without larvae. Besides, controls using *Artemia* nauplii as food were also used to assess the physiological condition of larvae. Two performance tests were made. In the first larvae at the stage M 1 were reared in 5 l conic bottom flasks with aeration at initial density of 60 l⁻¹. In the second one, PL 2 were reared in 1 l flat bottom flasks with aeration at initial density of 65 l⁻¹. Level replacement of *Artemia* nauplii by copepod offspring were: 0% (control), 50% (T1) and 100% (T2). The best concentration of copepods was about 5 copepod ml⁻¹ for M 2 and 3, but the low values of ingestion rates suggested that copepods may only be used as a food complement in this stage. In postlarval stages, the best concentration was about 10 copepod ml⁻¹ for PL 1 to 3 and 20 copepod ml⁻¹ for PL 5 to 7. In the first performance test the survival was not significantly different among treatments, although a high mortality occurred during the first 24 h. In the second one the survival was not significantly different in the T2 (40 %) and T1 (37%) treatments but it was significantly smaller in the control (18%). The larval growth was not significantly different among treatments in both tests. As conclusion, the offspring of *T. biminiensis* copepod is a potential live food item to be used in larviculture of *L. vannamei*, though another performance test must be made.

Key words: shrimp, larviculture, *Litopenaeus vannamei*, copepod

ÍNDICE

1. Introdução Geral.....	01
2. Objetivos.....	04
3. Capítulo I - Revisão do conhecimento sobre a alimentação no cultivo das larvas de camarões marinhos peneídeos.....	05
4. Capítulo II - Ingestion rate of <i>Litopenaeus vannamei</i> larvae as a function of <i>Tisbe biminiensis</i> copepod concentration.....	17
4.1 Abstract.....	18
4.2 Introduction.....	19
4.3 Materials and Methods.....	20
4.4 Results.....	23
4.5 Discussion.....	31
5. Capítulo III – Substituição de náuplios de <i>Artemia</i> pelo copépodo <i>Tisbe biminiensis</i> na larvicultura do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	34
5.1 Resumo.....	35
5.2 Introdução.....	36
5.3 Material e Métodos.....	37
5.4 Resultados.....	40
5.5 Discussão.....	52
6. Conclusão Geral.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	57
8. Anexo I - Can the brine shrimp <i>Artemia</i> sp. grow on the <i>Tisbe biminiensis</i> copepod offspring ?.....	63

1. Introdução Geral

A aquicultura vem se desenvolvendo nas últimas décadas em virtude da diminuição dos estoques naturais de pescado. Assim esta atividade vem suprir a demanda em pescado e derivados (Barbieri-Jr & Ostrenky-Neto, 2002). Para a aquicultura das Américas, o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) é considerado a espécie de peneídeo mais importante (Pedrazzoli *et al.*, 1998), bem como para o Brasil (Barbieri-Jr & Ostrenky-Neto, 2001).

Os estágios do desenvolvimento larval das espécies de peneídeos consistem em seis fases de náuplios, três de protozoéa e três de misis, sendo os demais estágios denominados de pós-larva. As pós-larvas são numeradas de acordo com a idade em dias, ou seja, pós-larva 1 tem um dia. A alimentação do camarão peneídeo nos estágios de náuplio consiste exclusivamente das suas reservas vitelinas. As larvas no estágio de protozoéa são herbívoras, e em misis e pós-larva são preferencialmente onívoras (Barbieri-Jr & Ostrenky-Neto, 2002; Le Vay *et al.*, 2001).

As modalidades de alimentação empregadas pelas larvas de decápodes são filtração e captura. Essas duas formas de obtenção de alimento são influenciadas pelos seguintes fatores: o tamanho, a qualidade e a quantidade de alimento ofertado às larvas (Jones *et al.*, 1997).

As larvas de crustáceos apresentam uma estrutura mandibular com espinhos e uma superfície trituradora que reflete uma adaptação morfológica dos hábitos alimentares herbívoro e carnívoro. Outra adaptação ao hábito alimentar herbívoro observa-se nos primeiros estágios de protozoéa dos peneídeos, uma vez que essas larvas apresentam uma grande área secretora de enzimas digestiva. Assim o divertículo anterior do intestino médio produz um requerimento enzimático para a digestão do fitoplâncton (Abubakr & Jones, 1992; Le Vay *et al.*, 2001). Entretanto, o hepatopâncreas é o principal órgão para a síntese e secreção de enzimas digestivas nos crustáceos (Guillaume & Ceccaldi, 2001).

Na fase herbívora da larvicultura de *L. vannamei* as diatomáceas do gênero *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp. *Phaeodaetylum* sp. (Barbieri & Ostrensky-Neto, 2001) vem sendo empregadas com sucesso. Provavelmente em virtude da grande

quantidade de ácidos graxos altamente insaturados que estas microalgas possuem, os quais são essenciais para o cultivo de peixes e crustáceos (Barreto & Cavalcanti, 1997).

O alimento animal mais utilizado na larvicultura de peneídeos é o náuplio de *Artemia* sp, visto que eles são aceitos pelas larvas, possuem valor nutricional e tamanho adequado, além de tecnologia simples para a estocagem dos cistos e produção dos náuplios (Gomes, 1986). No entanto, a produção dos cistos de *Artemia* sp. nem sempre atende à demanda crescente da aquicultura. A produção de cisto é resultado da extração das populações naturais sujeitas às variações ambientais, sobretudo as climáticas, e infecções virais. Estes fatos levam a grande variação nas safras anuais, elevando o preço no mercado, e à restrição na importação de cistos provindos de locais contaminados por vírus (Lavens & Sorgeloos, 1998; Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999). Outros alimentos vivos vêm sendo testados como substitutos parciais ou totais dos náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura, tais como rotíferos, nematódeos, copépodos, cladóceros entre outros (Lavens & Sorgeloos, 1998).

De acordo com Fleeger (2005), o emprego dos copépodos harpacticóides no cultivo das larvas de peixes marinhos propicia rápido crescimento e alta taxa de reprodução. Isto se deve à qualidade nutricional dos copépodos, uma vez que estes possuem alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), especialmente da série n-3; variado tamanho entre os estágios de náuplio ao adulto; e são palatáveis para as larvas dos peixes.

Os copépodos harpacticóides bentônicos dos gêneros *Tisbe* sp. podem ser propícios para serem empregados na larvicultura de peneídeos, uma vez que o cultivo é fácil em virtude dos copépodos apresentarem alta fecundidade, curto tempo de geração, limites extremos de tolerância às mudanças ambientais, ampla variedade de alimento disponíveis e alcançarem altas densidades populacionais (Kahan *et. al.*, 1981-1982; Lavens & Sorgeloos, 1996).

Além disso, os copépodos *Tisbe* sp. possuem grande quantidade de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA), que são ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) do grupo n-3 (Nanton & Castell, 1998). Esses ácidos graxos são essenciais para peixes e crustáceos marinhos, pois otimizam o crescimento e a sobrevivência (Barreto & Cavalcanti, 1997). Além disso, o tamanho dos náuplios e copepoditos do copépodo *T. biminiensis* (Volkman-Rocco, 1973) variam de 80 a 500

μm , respectivamente (Pinto *et al.*, 2006), sendo esse tamanho semelhante aos náuplios de *Artemia* sp, que mede aproximadamente 300 μm .

A técnica de cultivo do copépodo *T. biminiensis* já foi desenvolvida em volume de 500ml, sendo alcançado numa densidade de 205 indivíduos. ml^{-1} ao final de 28 dias de cultivo e com a taxa intrínseca de aumento populacional de 0.33 dia^{-1} (Souza-Santos *et al.*, 2006). Também já foi estabelecido por Ribeiro *et. al.* (2004) o cultivo desse copépodo em volume de 5L. Esses autores verificaram uma produção média de prole (náuplios e copepoditos) de cerca de 120.000 ind. $5\text{L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Desta forma, a disponibilidade desta tecnologia de cultivo pode viabilizar a utilização de *T. biminiensis* na larvicultura de *L. vannamei*. Esse trabalho teve como objetivos estimar a taxa de ingestão das larvas de *L. vannamei* e a concentração ótima da prole do copépodo *T. biminiensis* para alimentar estas larvas e testar a viabilidade da substituição parcial ou total dos náuplios de *Artemia* sp. pela prole do copépodo *T. biminiensis* na larvicultura de *L. vannamei*.

2. Objetivos

2.1. Geral

Testar o valor nutricional da prole de *T. biminiensis*, composta por náuplios e copepoditos, em substituição parcial ou total dos náuplios de *Artemia* sp. no cultivo das larvas de *L. vannamei*, em termos de sobrevivência e crescimento.

2.2. Objetivos do Capítulo I

2.2.1. Rever a literatura sobre a alimentação das larvas dos camarões peneídeos durante os estágios de protozoéa, misis e pós-larva.

2.2. Objetivos do Capítulo II

2.2.1. Estimar a taxa de ingestão das larvas de *L. vannamei* nutridas com a prole do copépodo *T. biminiensis*.

2.2.2. Estimar a concentração ótima da prole de *T. biminiensis* para alimentar a larva de *L. vannamei*.

2.3. Objetivos do Capítulo III

2.3.1. Comparar a sobrevivência, o comprimento e o peso seco das larvas de *L. vannamei* alimentadas com a prole de *T. biminiensis* em níveis de substituição parcial e total pelos náuplios de *Artemia* sp.

3. Capítulo I

Revisão do conhecimento sobre a alimentação no cultivo das larvas de camarões marinhos peneídeos

Introdução

A aquicultura é uma atividade que vem se ampliando devido à diminuição dos estoques naturais de pescado. Uma linha de cultivo na aquicultura que está se desenvolvendo é a carcinicultura (Barbieri-Jr & Ostrenky-Neto, 2002). Para uma adequada criação dos camarões é essencial uma alimentação de boa qualidade. Além disso, é importante oferecer um alimento em quantidade suficiente para o crescimento e desenvolvimento das larvas, principalmente nas fases iniciais do ciclo de vida.

O objetivo desse trabalho foi rever a literatura que trata sobre alimentação no cultivo das larvas de peneídeos durante os estágios de protozoéa a pós-larva. As espécies para as quais foram obtidos dados foram: *Penaeus semisulcatus* de Haan (1944), *Penaeus monodon* Fabricius (1798), *Litopenaeus vannamei* Boone (1931), *Penaeus japonicus* Bate (1888), *Penaeus indicus* Milne Edwards (1837), *Penaeus kerathurus* Forskäl (1775), *Penaeus marginatus* Randall (1840), *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) e *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967).

As espécies de peneídeos possuem 6 fases de náuplios, 3 de protozoéa e 3 misis, sendo os demais estágios denominados de pós-larva. Nos estágios de náuplios as larvas nutrem-se de suas reservas vitelinas. O alimento nas fases de protozoéa, misis e pós-larva consistem de microalgas, organismos planctônicos e bentônicos, respectivamente, visto que as larvas são planctônicas nos estágios de protozoéa e misis, e bentônicas nas demais fases (Barbieri-Jr & Ostrenky-Neto, 2002). Deste modo, na larvicultura das larvas de peneídeos é ofertada uma combinação de diferentes itens alimentares para as larvas ao longo do período de cultivo.

Alimento vivo

1. Microalga

Vários estudos citam as microalgas do gênero *Chaetoceros* sp. como um alimento adequado no cultivo de camarão peneídeos. Este fato é corroborado em virtude da sobrevivência média de 70 % no cultivo das larvas de *L. vannamei* alimentada com diatomáceas de gênero *Chaetoceros* sp. numa densidade de 150×10^3 células ml⁻¹

(Nuñez *et al.*, 2002) e de *P. japonicus* nutridas *Chaetoceros muelleri* numa densidade de 100×10^3 células ml^{-1} (D' Souza & Lorneragan, 1999) nos estágios de protozoéa. Entretanto, Piña *et al.* (2005) registraram uma sobrevivência média igual a 40% das larvas de *L. vannamei* no estágio de protozoéa quando alimentadas com *C. muelleri* numa densidade de 40 a 300×10^3 células ml^{-1} . Nos estágios de protozoéa 1 a pós-larva 1, a sobrevivência das larvas de *L. vannamei* foi igual a 53% quando nutrida com *Isochrysis* sp. numa densidade de 380 a 650×10^3 células ml^{-1} (Sánchez, 1986). A variação da porcentagem de sobrevivência das larvas de *L. vannamei* pode ser atribuída à manipulação dos cultivos diariamente ou aos diferentes regimes de cultivo empregados pelos autores.

Dieta constituída com apenas uma microalga pode causar falta ou deficiência de algum nutriente essencial (Piña *et al.*, 2006). Deste modo, vários autores sugerem a combinação de microalgas para reduzir estes riscos e melhorar o crescimento e sobrevivência das larvas de peneídeos durante os estágios de protozoéa. As larvas de *P. japonicus* alcançaram uma sobrevivência significativamente maior e rápido desenvolvimento (Villegas & Kanaza, 1979) quando alimentadas com a combinação de *C. mulleri* e *Tetraselmis suecica* do que com essas microalgas separadamente (D' Souza & Lorneragan, 1999). Também as larvas de *L. vannamei* obtiveram sobrevivência e índice de desenvolvimento segundo Villegas & Kanaza (1979) significativamente maior nos tratamentos com *C. mulleri*, *C. muelleri* + *T. suecica*, *C. muelleri* + *Isochrysis* sp. e a combinação das três microalgas (Piña *et al.*, 2006).

Tobias-Quinitio & Villegas (1982) registraram uma mesma sobrevivência média de 48% quando as larvas de *P. monodon* foram alimentadas com *Tetraselmis chuii* e *Chaetoceros calcitrans* numa densidade de 50 a 100×10^3 células ml^{-1} durante os estágios de protozoéa 1 a misis 3. No entanto segundo Villegas & Kanaza (1979) nos estágios de protozoéa 1 e 2 foi constado uma redução significativa de 6% na sobrevivência e na taxa de crescimento das larvas nutridas com *T. chuii*. Este foi atribuído ao menor tamanho (4-5 μm) de *C. calcitrans* em comparação com *T. chuii* (12-15 μm) e sugerem uma tendência de seletividade de tamanho de alimento nos estágios de protozoéa e misis. Embora, esta tendência de seletividade não tenha sido observada para as larvas de *L. vannamei* no estágio de protozoéa a misis 1, uma vez que elas consumiram 800×10^3 células larva $^{-1}$ nos tratamentos com *C. muelleri* + *T. suecica*, *C.*

muelleri + *Isochrysis* sp., *T. suecica* + *Isochrysis* sp., a combinação das três microalgas ou elas isoladamente com exceção de *T. suecica* (Piña *et al.*, 2006).

A microalga *T. chuii* foi menos consumida pelas larvas de *L. vannamei* nos estágios de protozoéa do que *Thalassiosira pseudonama*, *Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*. Enquanto, as espécies *Chatoceros gracilis* e *C. calcitrons* foram as mais ingeridas pelas larvas de *L. vannamei* em relação às outras microalgas citadas (Nuñez *et al.*, 2002).

Piña *et al.* (2006) constatou uma mortalidade das larvas de *L. vannamei* o estágio de protozoéa 3 quando nutridas com *T. suecica*. O autor atribuiu essa mortalidade a ausência de ácidos docosahexaenóico nesta microalga. Segundo Barreto & Cavalcanti (1997), os ácidos graxos altamente insaturados da série n3, tais como o ácido docosahexaenóico (20:5n3) e ácido eicosapentaenóico (22:6n3), são essenciais para os crustáceos marinhos, pois eles melhoram a sobrevivência e crescimento das larvas de peneídeos durante o cultivo. A diatomácea *C. muelleri* é a mais recomendada para os cultivos das larvas de peneídeos, uma vez que ela apresenta maior proporção de ácidos graxos altamente insaturados (20:4n6, 20:5n3 e 22:6n3) e monosaturados do que *T. suecica* (D' Souza & Lorneragan, 1999; Piña *et al.* 2006) e *Isochrysis* sp. (Piña *et al.*, 2006).

Outros aspectos que deve ser estudados no cultivo das larvas de peneídeos são as taxas de ingestão e a concentração ideal de alimento. Segundo Samocha *et al.* (1989), o conhecimento sobre estes parâmetros é importante para a larvicultura, pois evita a perda de alimento, a subnutrição e a sujeira nos tanques de cultivo. Assim as larviculturas promovem uma eficiente estratégia de crescimento e desenvolvimento larval.

As larvas de *P. indicus* alimentadas com *Thalassiosira weissflogii* obtiveram uma concentração limitante de ingestão (menor concentração antes da taxa de ingestão ser limitante) igual a 6×10^3 células ml⁻¹ para protozoéa 2, $6,5 \times 10^3$ células ml⁻¹ para misis 1, 13×10^3 células ml⁻¹ para misis 3 e 16×10^3 células ml⁻¹ para pós-larva 1. A máxima taxa de ingestão foi de $2,5 \times 10^3$ células larva⁻¹ h⁻¹ em protozoéa 1, 12×10^3 células larva⁻¹h⁻¹ em misis 3 e $6,2 \times 10^3$ células larva⁻¹h⁻¹ em pós-larva 1 (Emmerson, 1980).

A concentração limitante de ingestão das larvas de *P. monodon* nutridas com *Tetraselmis* sp. foi igual a 10×10^3 células ml⁻¹ para protozoéa 1 a 2, $17,5 \times 10^3$ células ml⁻¹ para protozoéa 3, 25×10^3 células ml⁻¹ para misis 1, $27,5 \times 10^3$ células ml⁻¹ para

misis 3 e 40×10^3 células ml^{-1} para pós-larva 1. A máxima e mínima taxa de ingestão foi de 14 a 16×10^3 células $\text{larva}^{-1}\text{h}^{-1}$ em misis 3 e mínimo de 4 a 6×10^3 células $\text{larva}^{-1}\text{h}^{-1}$ em pós-larva 1 (Loya-Javellana, 1989).

Nos dois trabalhos citados acima se observa um aumento seguido de um declínio da taxa de ingestão de microalgas com o desenvolvimento das larvas de peneídeos, este fato é devido à mudança da modalidade de alimentação de filtração para captura que ocorre durante nos estágios iniciais de pós-larva. Assim, neste estágio larval as larvas necessitam de itens alimentares maiores (Emmerson, 1980).

Em face do exposto, pode-se concluir que as larvas de peneídeos nutridas com as diatomáceas do gênero *Chaetoceros* sp. apresentaram os melhores resultados quanto a sobrevivência e desenvolvimento. Este fato se deve ao adequado tamanho dessas microalgas para a ingestão das larvas e à presença de grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados. No cultivo comercial é mais apropriada a utilização da combinação de duas ou três microalgas do que apenas uma microalga, uma vez que a combinação de itens alimentares reduz a carência de algum nutriente. Nos estágios de protozoéa a misis, as microalgas são preferencialmente ingeridas devido ao fato do mecanismo de alimentação ser por filtração. Nos estágios de pós-larvas são necessários itens alimentares maiores para suprir à demanda de nutrientes pelas larvas, visto que neste estágio ocorre mudança de modalidade de alimentação.

2. Alimento vivo animal

A dieta dos camarões peneídeos modifica-se com a idade e tamanho dos camarões. Este fato é atribuído à mudança do hábito das larvas de planctônico para bentônico, que é acompanhada de alterações do sistema digestivo e assimilação de diferentes itens alimentares (Dall *et al.*, 1990).

Os náuplios de *Artemia* sp. são o alimento vivo animal mais utilizado no cultivo das larvas de peneídeos, devido à sua ampla aceitação pelas larvas, seu valor nutricional, seu tamanho e fácil tecnologia para a estocagem dos cistos e eclosão dos náuplios (Gomes, 1986).

A concentração ideal de náuplios de *Artemia* sp. para as larvas de *P. marginatus* durante os estágios de protozoéa a pós-larva foi de 1 a 3 *Artemia* ml^{-1} . Em

concentrações superiores e inferiores a esta se observou canibalismo e sujeira no cultivo, respectivamente, o que propiciou a redução da sobrevivência das larvas. A taxa de ingestão foi cerca de 10 a 20 *Artemia* ml⁻¹dia⁻¹ para protozoéa 1 e 40 a 50 *Artemia* larva⁻¹dia⁻¹ para protozoéa 3 (Golakrishnan, 1976). A concentração de 5 *Artemia* ml⁻¹ é ideal para as larvas de *P. indicus* durante os estágios de protozoéa 3 a misis 3. A taxa de ingestão e máxima ingestão de energia por larva por dia foram 95 *Artemia* larva⁻¹ dia⁻¹ e 4 J larva⁻¹ dia⁻¹ para protozoéa 3 a misis 1, e 31 *Artemia* larva⁻¹ dia⁻¹ e 1,34 J larva⁻¹ dia⁻¹ para misis 2 a 3. Para pós-larva 1, a máxima taxa de ingestão e a máxima energia ingerida por larva por dia foram 213 *Artemia* larva⁻¹ dia⁻¹ e 8,2 J larva⁻¹dia⁻¹, respectivamente, na concentração de 9 *Artemia* ml⁻¹ (Emmerson, 1984). As larvas de *P. kerathurus* nutridas com náuplios de *Artemia* sp. numa densidade de 15 a 18 *Artemia* ml⁻¹ obtiveram uma taxa de ingestão de 48 a 62 *Artemia* larva⁻¹ dia⁻¹ nos estágios de misis 2 a 3, e 77 a 100 *Artemia* larva⁻¹ dia⁻¹ para os estágios de pós-larva 1 a 3 (Yúfera *et al.*, 1984).

Apesar da ótima utilização dos náuplios de *Artemia* sp. como alimento para as larvas de peneídeos, a produção dos cistos de *Artemia* sp. ne sempre atende à demanda crescente pelas aqüiculturas. Desta forma, outros alimentos vivos vêm sendo testados como substitutos parciais ou totais dos náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura de peneídeos, tais como rotíferos, nematódeos, copépodos, cladóceros entre outros (Lavens & Sorgeloos, 1998).

O rotífero *B. plicatilis* é sugerido como alimento durante a fase de transição entre a dieta algal e animal, em virtude do tamanho intermediário entre 50 a 300 µm. Assim poderia promover melhores resultados de sobrevivência e crescimento das larvas de peneídeos (Samocha *et al.*, 1989).

No estágio de protozoéa 1 as larvas de *P. kerathurus* não ingeriram rotíferos *B. plicatilis* ((Emmerson, 1894; Yúfera *et al.*, 1984), talvez devido a incompleta formação dos olhos (Emmerson, 1984). As larvas de *P. semisulcatus* nos estágios de protozoéa 2 a pós-larva 1 nutridas com a combinação do rotífero *B. plicatilis* (20 ml⁻¹) mais náuplios de *Artemia* sp. (9 ml⁻¹), ou apenas náuplios de *Artemia* sp. (9 ml⁻¹) obtiveram uma sobrevivência média igual a 85% que não foi diferente significativamente. Apenas no tratamento apenas com o rotífero (20 ml⁻¹) a sobrevivência foi significativamente menor (70%) O peso seco médio final das larvas não foi significativamente diferente e igual a 193 µm nos tratamentos com apenas náuplios de *Artemia* sp. (9 ml⁻¹) e com rotífero

ofertado somente no estágio de protozoéa 2 (20 ml⁻¹), sendo nos demais estágios larvais alimentados com náuplios de *Artemia* sp. (9 ml⁻¹) (Samocha *et al.*, 1989).

As larvas de *P. kerathurus* também ingeriram o rotífero *B. plicatilis* nos estágios de protozoéa 2 a pós-larva 2. No estágio de protozoéa 2 foi observado uma preferência de ingestão de rotíferos com tamanho de 100 a 160µm, enquanto em protozoéa 3 constatou-se uma preferência por rotíferos com tamanho de 160 a 248µm. Portanto, deve haver uma seletividade de alimento durante estes estágios larvais (Yúfera *et al.*, 1984).

A taxa de ingestão das larvas de *P. kerathurus* alimentadas com rotífero nos estágios de protozoéa 2 a pós-larva 2 foi de 518 a 213 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ numa densidade de 20 rotíferos ml⁻¹ e 253 a 128 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ numa densidade de 10 rotíferos ml⁻¹ (Yúfera *et al.*, 1984). Também as larvas de *P. indicus* ingeriram o rotífero *B. plicatilis* nos estágios de protozoéa a pós-larva. A taxa máxima de ingestão e a máxima energia ingerida por larva por dia foram 230 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ e 0,82 J larva⁻¹ dia⁻¹ nos estágios de protozoéa 1 a 2 numa densidade de 10 rotíferos ml⁻¹, 270 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ e 0,99 J larva⁻¹ dia⁻¹ em protozoéa 2 a 3 numa densidade de 13,7 rotíferos ml⁻¹, 300 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ e 1 J larva⁻¹ dia⁻¹ em protozoéa 3 a misis 1 numa densidade de 11,6 rotíferos ml⁻¹, 138 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ e 0,5 J larva⁻¹ dia⁻¹ em misis 2 a 3 e 170 rotíferos larva⁻¹ dia⁻¹ e 0,6 J larva⁻¹ dia⁻¹ em misis 3 a pós-larva 1 (Ermerson, 1984).

Ermerson (1984) e Yúfera *et al.* (1984) observaram a taxa máxima de ingestão de rotíferos entre protozoéa 2 e misis 1; e nos demais estágios foi constatada uma redução na taxa de ingestão. As larvas de *P. indicus* alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. apresentaram uma aumento contínuo da máxima ingestão com o desenvolvimento larval. A redução da taxa de ingestão de rotíferos deve ter sido devido à redução na eficiência de captura por larvas maiores, em virtude do menor tamanho do rotífero *B. plicatilis* (100 a 240µm) quando comparado ao náuplio de *Artemia* (Yúfera *et al.*, 1984).

Os resultados mencionados indicam que o rotífero *B. plicatilis* é apropriado como alimento durante protozoéa 2 a misis 1 numa densidade de 15 a 25 rotíferos ml⁻¹. A partir do estágio de pós-larvas as larvas de peneídeos requerem alimentos de tamanhos maiores, tal como os náuplios de *Artemia* sp. A concentração ótima de

núplios de *Artemia* sp. é igual a 5 *Artemia* ml⁻¹ para os estágios de protozoéa 3 a misis 1 e 10 a 15 *Artemia* ml⁻¹ a partir de misis 1 até pós-larva.

Alimento inerte

Além do alimento vivo emprega-se na larvicultura de camarão o alimento inerte. O alimento vivo, tais como os núplios de *Artemia* sp. e rotífero, apresenta diferentes padrões de crescimento e reprodução o que pode influenciar a eficiência de captura das larvas. Além disso, o alto custo do cultivo de alimento vivo com alimentação e mão de obra qualificada eleva o custo das larviculturas. Para reduzir estes efeitos foi desenvolvido o alimento inerte (Kurmalý, 1989). Desta forma, nos cultivos submetidos à dieta inerte tem-se um melhor controle do tamanho e da composição da dieta ofertada às larvas (Jones *et al.* 1987).

Nos primeiros estudos se fabricou partículas inertes a partir de receitas manufaturadas. Hirata *et al.* (1975) formularam uma receita de bolo de soja (“SC”) e testaram com as larvas de *P. japonicus* nos estágios de protozoéa. Eles registraram a maior sobrevivência larval (85,9%) na concentração de 0,16 mg SC protozoéa⁻¹ dia⁻¹. Em relação ao crescimento larval, as larvas aumentaram de tamanho com a maior quantidade de alimento ofertado a elas. Os tamanhos mínimo (133 µm) e máximo (198 µm) das larvas foram constatados nas concentrações de 0,03 e 0,417 mg SC protozoéa⁻¹ dia⁻¹, respectivamente.

Quando se comparou a sobrevivência e o crescimento das larvas submetidas às dietas com SC, a diatomácea *Chaetoceros rigidus* e a mistura dos dois tipos de alimentos. Constatou-se a melhor sobrevivência e crescimento larval na dieta formada por SC e a microalga (Hirata *et al.* (1975).

Jones *et al.* (1979) também submeteram às larvas de *P. japonicus* no estágio de protozoéa 1 a dietas formadas com: 1) ovos e o molusco *Tapes philippinarum*, 2) ovos e SC fresco, 3) ovos e SC cozido. As larvas alimentadas com ovos e *T. philippinarum* atingiram o estágio de pós-larva e a sobrevivência foi em torno de 50% numa concentração de 500 cápsulas ml⁻¹. Estes resultados foram semelhantes ao controle com *Chaetoceros gracilis* e núplios de *Artemia* sp. Além disso, estes dados foram melhores em relação às outras dietas.

As larvas submetidas às dietas com SC cozido morreram próximo ao sexto dia de cultivo, enquanto as lavas nutridas com SC fresco estavam vivas perto do período final de incubação (14 dias). A maior sobrevivência e o crescimento das larvas submetidas à dieta com SC fresco foram provavelmente devido à presença de bactérias vivas e leveduras que acompanham as partículas alimentares. Fato não ocorrido na dieta com SC cozido devido o cozimento do SC. A proliferação bacteriana pode ser acelerada pelo excesso de SC fornecido as larvas, o que pode resultar numa rápida contaminação da água dos tanques de cultivo (Jones *et al.*, 1979).

Para proteger o alimento contra a degradação e dissolução observada nas partículas de SC, desenvolveu-se a tecnologia de microencapsulação. Este alimento é composto por nutrientes balanceados envolvidos com uma cápsula biodegradável. As dietas microencapsuladas para serem apropriadas para as larvas devem apresentar as seguintes características: aceitabilidade, digestibilidade, tamanho adequado das partículas e estabilidade na água. O principal problema enfrentado nesse tipo de alimento é a degradação microbiana (Jones *et al.*, 1987).

A seletividade alimentar é um aspecto que deve ser observado no preparo dos alimentos manufaturados e microencapsulados. Um dos métodos para calcular a preferência alimentar é o índice de Cheeson (α), que corresponde à proporção de microalga no estômago das larvas. Este índice é calculado através da comparação da quantidade de pigmento detectado por indivíduo e no controle (Marín-Magan & Cañavate, 1995).

As larvas de *P. japonicus* nos estágios de protozoéa 2 a 3 e misis 1 foram submetidas à dieta com *T. chuii* e a combinação desta microalga com o microencapsulado “cross-linked-protein-walled” (CAR I, Frippak feeds). A seletividade alimentar destas larvas foram analisadas através do índice de Cheeson (α). Durante os estágios de protozoéa, as duas dietas foram ingeridas na mesma proporção ($\alpha = 0,49$). No estágio de misis 1 observa-se a predominância da ingestão do microencapsulado ($\alpha = 0,9$). Este fato é atribuído à facilidade de apreensão das partículas inertes pelo aparelho alimentar das larvas durante esta fase do desenvolvimento, bem como à morfologia e dimensão do microencapsulado cujo diâmetro é de 9,5 μm (Marín-Magan & Cañavate, 1995).

Segundo Jones *et al.* (1979) o tamanho ótimo das partículas alimentares para as larvas de *P. japonicus* é em torno de 10 μm para protozoéa 1 e 28 μm para misis 2 a 3. Entretanto, as larvas de *P. monodon* nos estágios de protozoéa ingerem partículas

alimentares inertes menores que 30 μm e também rotíferos com 100 μm . Embora as larvas apresentarem um hábito alimentar preferencialmente herbívoro no estágio de protozoéa, elas conseguem realizar as modalidades de alimentação por filtração ou captura dependendo do tamanho da partícula alimentar. Além disso, quimiosensores atuam na ingestão e rejeição das partículas alimentares (Kurmary *et al.*, 1989).

O emprego de combinação de dietas no cultivo das larvas de peneídeos é uma prática que apresenta resultados satisfatórios na sobrevivência e crescimento. A sobrevivência das larvas de *P. japonicus* nutridas com a dieta comercial (Kyow Hakkō Co. Ltd.), na concentração de 0,16 mg larva⁻¹ dia⁻¹, nos estágios de protozoéa e misis foi 83% e 79%, respectivamente. Estes valores foram semelhantes aos observados para as larvas submetidas à mistura das dietas comercial e a diatomácea *C. gracili* (Jones *et al.*, 1979).

Também as pós-larvas 1 a 30 de *Farfantepenaeus paulensis* apresentaram melhores resultados de sobrevivência (90 %) e crescimento quando submetidas a tratamentos com combinação de dietas. Estes tratamentos eram constituídos de dietas com náuplios de *Artemia* sp., náuplios de *Artemia* sp. + microalgas (*Chaetoceros calcitrans* e *Tetraselmis chuii*) e náuplios de *Artemia* sp. + microalgas + dieta comercial (Lansy PL) (Soares *et al.*, 2006).

Do mesmo modo, a sobrevivência das larvas de *P. monodon* foi de 75 a 85% com dieta composta pelas microalgas: 1) *T. chuii*, 2) *Rhodomonas baltica*, 3) *T. chuii* + *R. baltica*. A sobrevivência larval também foi em torno de 80% com dietas formadas pela combinação de microencapsulados (Frippak Feeds: RDX10, CD435, X13D, RDX24, Topal) e microalgas, tais como: 1) *T. chuii* + *R. baltica* + RDX10 + CD435, 2) *T. chuii* + *R. baltica* + X13D + CD435, 3) *T. chuii* + *R. baltica* + RDX24 + CD435 e 4) *T. chuii* + *R. baltica* + Topal. Em relação ao crescimento larval, os melhores resultados foram obtidos nas dietas com *R. baltica* (0,37 mm.dia⁻¹) e *T. chuii* + *R. baltica* + X13D + CD435 (0,34 mm.dia⁻¹). Estes fatos devem ser devido à presença de maior quantidade de lipídeos das séries 18:3n6 (2,7 %), 20: 4n6 (3 %), 22: 6n3 (7,6 %) na microalga *R. baltica* em comparação as demais. Fato também observado para o microencapsulado RDX24, cujos valores foram 14,3% para o lipídeo 18:2n6, 15,7 % para o lipídeo 20:5n3 e 10,4 % para o lipídeo 22: 6n3 (Kurmary *et al.*, 1989). De acordo com Barreto & Cavalcanti (1997), os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) otimizam a sobrevivência e o crescimento das larvas de peneídeos. Portanto, nas larviculturas de *P. japonicus*, *F. paulensis* e *P. monodon* a dieta comercial é um item

alimentar que deve ser usado juntamente com microalgas, uma vez que as microalgas também funcionam como um biofiltro para a manutenção da qualidade da água nos tanques de cultivo.

As larvas de *L. vannamei* no estágio de protozoéa III foram alimentadas com: 1) microencapsulado; 2) *T. chuii*, *Chaetoceros cerastosporum* e *Artemia* sp.; 3) a mistura de ambas dietas. Em todas as dietas testadas as larvas atingiram o estágio de pós-larva 1 e não foi verificada diferença significativa no índice de desenvolvimento, no índice de qualidade, na sobrevivência (96 a 98%), no crescimento em comprimento (2,55 a 2,96 % por dia) e crescimento em peso seco (4,92 a 7,13 % por dia) das larvas. Com base nestes resultados, os autores constataram que os náuplios de *Artemia* sp. podem ser substituídos na larvicultura por dietas formadas por microencapsulados ou a mistura do alimento inerte e as microalgas (Pedroza - Islãs *et al.*, 2004).

As larvas de *Farfantepenaeus aztecus* no estágio de náuplios 5 foram submetidas aos tratamentos com pasta de microalga (Instant Algae^{TIM}) e dietas inertes. Os níveis de substituição da microalga *Chaetoceros muelleri* pela pasta de microalga e as dietas inertes foram: 0 % (controle), 50 % e 100%. No tratamento com 100% de substituição, a sobrevivência larval, o comprimento e o peso final das pós-larvas foram significativamente menores que no controle. Na dieta com Instant Algae^{TIM}, os autores constataram mortalidade total das larvas, provavelmente devido à deficiência nutricional da dieta e o inadequado preparo do produto. No tratamento com 50 % de substituição, a sobrevivência larval para as dietas Instant Algae^{TIM} (85%) e as dietas inertes Licalife^{TIM} (88,14%) e Epifeed^{TIM} (79,43%) não foi significativamente diferente do controle (90,86%), Entretanto, o comprimento e o peso das pós-larvas foram significativamente maiores no controle do que nas outras dietas (Robinson *et al.*, 2005).

Na larvicultura de *F. aztecus* também foi testada a substituição do náuplios de *Artemia* sp. pela pasta de microalga e as dietas inertes. Os níveis de substituição do náuplios de *Artemia* sp. pela pasta de microalga e as dietas inertes foram: 0 % (controle), 50 % e 100 %. No tratamento com 100 % de substituição, as larvas nutridas com as dietas inertes obtiveram valores de sobrevivência, comprimento e peso finais significativamente menores quando comparados ao controle. No tratamento com 50% de substituição, a sobrevivência larval foi significativamente maior apenas na dieta com Licalife^{TIM} (92,14 %) e no controle (93,43 %). O comprimento e o peso foram significativamente maiores no controle do que nas demais dietas (Robinson *et al.*, 2005).

Lima, L. C. M.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que os microencapsulados comerciais devem ser ofertados às larvas de peneídeos juntamente com os alimentos vivos, como um complemento alimentar, durante os estágios de protozoéa a pós-larva.

4. Capítulo II

**Ingestion rate of *Litopenaeus vannamei*
larvae as a function of *Tisbe biminiensis*
copepod concentration**

Abstract

Artemia nauplius is the food usually used in culture of *Litopenaeus vannamei* larvae. However, the production of *Artemia* cysts not always reaches the increasing demand of aquaculture. Thus, alternative diets need to be tested. The objective of this study was to determine the ingestion rate of the *L. vannamei* larvae fed on different offspring concentrations of *Tisbe biminiensis*, composed by nauplii and copepodites, and to estimate the best food concentration. Two types of ingestion rate experiments were made one using flat bottom flasks without aeration and another with conic bottom flasks with aeration. In the first type, larvae in the mysis 2 and 3 stages and postlarvae 1, 3, 5 and 7 were stocked individually in vessels containing 50 ml of seawater. In the other type, groups of 6 larvae in the stages mysis 2 and 3 were stocked in vessels containing 300 ml of seawater. In both experiments, the vessels containing seawater of salinity 31-33 were incubated for 24 h, at 25-30°C and the photoperiod of 13h light/11 h dark. Four treatments were tested with different copepod offspring concentrations as well as controls without shrimp larvae. Besides, controls using *Artemia* nauplii as food were also used to verify the physiological condition of tested larvae. The larval survival was observed at the end of incubation period, and the vessel contents were preserved for further copepod counting. In experiments using conic bottom flasks with aeration, the best concentration of copepods was about 5 copepod ml⁻¹ for mysis 2 and 3, respectively. The mean ingestion rate was 56.7 ± 9 and 188 ± 203 copepod larva⁻¹ day⁻¹ for mysis 2 and 3, in that order. In the other type of experiment, mysis 2 did not ingest copepods and mysis 3 ingested only 24.5 ± 10 copepod larva⁻¹ day⁻¹. In postlarval stages, the best concentration of copepod was about 10 copepod ml⁻¹ for postlarvae 1 to 3 and 20 copepod ml⁻¹ for postlarvae 5 to 7. The mean ingestion rate was 185 ± 69 copepod larva⁻¹ day⁻¹ for postlarva 1, 229 ± 45 copepod larva⁻¹ day⁻¹ for postlarva 3, 342.8 ± 98 copepod larva⁻¹ day⁻¹ for postlarva 5 and 293 ± 45 copepod larva⁻¹ day⁻¹ for postlarva 7. As conclusion, the offspring of *T. biminiensis* copepod was ingested by *L. vannamei* larvae in the stage mysis and postlarva and the ingestion rate increased with larval development. Thus, the offspring of *T. biminiensis* copepod is a potential live food to be tested in larviculture of *L. vannamei*.

Introduction

Diet is a fundamental factor for larval development of decapod crustaceans. Size, quantity and quality of food offered to the larvae are aspects that affect larval development (Jones *et al.*, 1997). Knowledge on ingestion rates and optimal food concentrations are important to get an efficient strategy optimizing growth and development in the culture of larval decapods. This information avoids overfeeding, which can increase the culture cost as well as decrease the water quality in tanks and also avoids larval starving (Samocha *et al.*, 1989).

The marine shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) is commonly cultivated in Brazil (Barbieri-Jr and Ostrensky-Grandchild, 2001). The *Artemia* nauplius is the live animal food most used in shrimp culture. Due to its nutritional value and size, it is greatly accepted by the larvae. Besides, the *Artemia* nauplius has an easy cyst stocking technology as well as hatching (Lavens and Sorgellos, 1996). However, the production of *Artemia* cysts not always supplies the increasing demand of shrimp aquaculture. The cysts are collected from the natural environment and are subject to climatic variations and viral infections that can cause crop variations. As a result, the price of the cysts increases or the importation of cysts needs to be restricted (Lavens and Sorgeloos, 1998; Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999). Thus, rotifers, copepods, nematodes, and cladocerans have been used to try to partially or completely replace the *Artemia* nauplius as live food (Lavens and Sorgeloos, 1996).

Studies have shown that the use of harpacticoid copepods as food may promote rapid growth rate in fishes and invertebrates (Fleeger, 2005). Harpacticoid copepods have highly unsaturated fatty acids (HUFA), especially the n-3 fatty acids, if compared with other live foods used in aquaculture. In addition, the high range of body sizes exhibited by these copepods makes amenable to predation by larvae and juvenile fishes (Fleeger, 2005).

In the present work, the main objective was to determine ingestion rates of *L. vannamei* larvae fed on different concentrations of the *Tisbe biminiensis* offspring (Volkman-Rocco, 1973), composed by nauplii and copepodites, to estimate the best offspring concentration to feed *L. vannamei* larvae.

Materials and Methods

1. Microalgae culture

The diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) were cultivated in f/2 medium (Guillard, 1975). For medium preparation, natural filtered seawater (25 and 3 μ m) was used at salinity 35. Tris-HCl buffer (25% v/v and pH = 7.8) and f/2 nutrients were added before medium sterilization in autoclave for 15 min at 121°C. After medium sterilization, biotin, B12 and thiamine were added just before algal inoculation. Those vitamins were sterilized by filtration (0.2 μ m) beforehand. The microalgal cultures were incubated at 24-27°C with a 12 h light/dark photoperiod.

2. Copepod culture

The copepod *T. biminiensis* has been reared in laboratory for several generations in 500 ml or 5l vessel with seawater filtered through 25 and 3 μ m at salinity 31-33. Cultures were maintained at 29-31°C, natural photoperiod of 13h light/ 11 h dark and provided with constant aeration (Souza-Santos *et al.*, 2006). Copepods were fed on the diatoms *Chaetoceros muelleri* or *Thalassiosira fluviatilis* and commercial fish food (Alcon Basic[®]). Every other day, the seawater was completely changed. The collection of the offspring was carried out with a couple of sieves with 63 and 250 μ m mesh size. The 250 μ m sieve retained mainly adult copepods and egg-bearing females, while the 63 μ m sieve retained mainly nauplii and copepodites, the offspring that was used as live food for larvae (Souza-Santos and Ribeiro, in preparation).

3. Ingestion rate

The larvae were obtained from Aqualider Company located in Ipojuca (Pernambuco, Brazil), 50 Km far from the laboratory. They were transported in plastic bags of 5 l containing approximated 2.5 l of cultivation water and oxygen in polystyrene

recipients to avoid great temperature changes. Arriving to the laboratory, the larvae were immediately stocked one by one in experimental flasks using Pasteur pipettes.

Two types of ingestion rate experiments were performed using flat bottom flasks without aeration and using conic bottom flasks with aeration. The former type was used to simplify the experiment and to permit to test a great number of replicates. The second type was done mainly in earlier larval stages in order to promote better copepods' suspension which must facilitate copepods' capture by larvae.

The flasks were maintained at natural photoperiod of 13h light/ 11h dark and were incubated for 24 h. The temperature was 28-30°C for experiments using flat bottom flasks without aeration and 25-27 °C for those using conic bottom flasks with aeration.

In the experiments using flat bottom flasks without aeration, the larvae were individually stocked in glass flat bottom flasks containing 50 ml of filtered seawater at salinity 31-33. It was tested four treatments with different copepod concentrations offered to shrimp at mysis stages 2 and 3, and postlarvae 1, 3, 5 and 7 (Table 1). A total of 10-12 replicates per treatment were run in all experiments, but for controls without larvae only 5 replicates were used. *Artemia* nauplii were also offered to shrimp in the stages mentioned above as control of the physiological condition of the larvae.

In the other type of experiments, groups of six larvae were stocked in plastic conic bottom flasks with aeration containing 300 ml of filtered seawater at salinity 31-33. Four different concentrations were offered to shrimp in mysis stages 2 and 3 (Table 1). Controls without larvae and with *Artemia* nauplii were also used. All treatments and controls had 5 replicates.

To compare both experimental types used here, the ingestion rate of postlarvae 7 was also estimated using both flat and conic bottom flasks at a concentration of 34-35 *Artemia* ml⁻¹.

At the end of incubation period, larval survival was observed. The incubation flasks' contents were preserved in formalin 4 % v/v and stained with Rose Bengal for further copepod counting. The daily ingestion rate of larvae (food. larva⁻¹ day⁻¹) was calculated using the equation: (mean final food number in controls without larvae – final food number in each replicate of treatments). number of larva⁻¹. In the experiment using flat bottom flasks without aeration, final number of food items was determined by counting all food items. In the experiment using conic bottom flasks with aeration, the final number of food items of each replicate was determined by taken and counting 5 sub-samples of 10 ml. To perform the sub-sampling the preserved food items were re-

suspended in 300 ml of water that was stirred in order to get homogeneous distribution of food items. The mean value of these sub-samples was multiplied by 30 to estimate the final number of food items in each replicate.

Table 1. Food concentration and the proportion of nauplius in the offspring offered to shrimp *L. vannamei* at different larval stages in experiments using flat bottom flasks without aeration and conic bottom flasks with aeration.

Flat bottom flaks without aeration			Food concentration			
Stages	Proportion of copepod nauplii (mean \pm confidence interval)		copepod ml ⁻¹		<i>Artemia</i> ml ⁻¹	
Mysis 2	41.5 \pm 3	8	15	24	43	10
Mysis 3	8.5 \pm 1	3	5	7	14	9
Postlarva 1	12.8 \pm 1	3	5	7	13	7
Postlarva 3	17.8 \pm 2	6	10	19	23	6
Postlarva 5	24.1 \pm 3.5	20	34	50	65	16
Postlarva 7	24.9 \pm 5.5	17	24	34	---	34

Conic bottom flasks with aeration			Food concentration			
Stages	Proportion of copepod nauplii (mean \pm confidence interval)		copepod ml ⁻¹		<i>Artemia</i> ml ⁻¹	
Mysis 2	34.6 \pm 5	5	8	12	16	20
Mysis 3	25.6 \pm 5	4	6	13	20	13

The proportion of nauplii and copepodites in the offspring varied between experiments but not inside each experiment testing one larval stage. This proportion was estimated from final number of copepods in controls without larvae (Table 1). The offspring was sampled one day before the experiments and feed only on microalgae in order to avoid remains of ration during experiments, that last one day. Thus, the proportion of nauplii and copepodites was calculated 48h after the sampling of the offspring. Since the time spent as nauplius varied from 2 to 3 days (Pinto *et al*, 2001), the proportion of nauplii was expected to be smaller than the proportion of copepodites.

4. Statistical analyses

The variation of mean ingestion rates among copepod concentrations to each larval stage were compared using one-way analyses of variance (ANOVA), after testing data for normality (Kolmogorov-Smirnov Test) and variance homogeneity (Cochran's C Test). The non-parametric test of Kruskal-Wallis was used when data were not normal or variances were not homogenous. When the ANOVA identified significant differences among concentrations, Tukey test was used for pairwise comparisons. The significance level was 0.05 for all tests.

Results

1. Experiments using flat bottom flasks

The larvae that did not ingest food during the experiments were not considered in the next data analysis. It means that the final number of food items in the treatment replicate was similar or greater than the mean final number in controls without larvae.

All tested larvae during mysis 2 stage did not ingest copepods during this experiment. The ingestion rate in controls using *Artemia* nauplii was 65.3 ± 33 (mean \pm standard deviation) *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹. It was observed that with increase of copepod concentration the larval survival decreased from 83.3 % to 50 %. On the other hand, in controls using *Artemia* larval survival was 100 %.

The ingestion rate during mysis 3 did not have significant differences between all copepod concentrations from 3 to 14 copepod ml⁻¹ and had a general mean of 24.5 ± 10.2 copepod larva⁻¹ day⁻¹ (ANOVA, $F=1.449$, $p=0.2574$) (Fig. 1A). In the control using *Artemia* nauplii the ingestion rate and larval survival were 81.5 ± 28.3 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹ and 100%, respectively. The larval survival varied from 90 to 100% in all treatments where copepods were used, except in the treatment of 14 copepod ml⁻¹ which survival was 60%.

The ingestion rate during postlarva 1 significantly increased with copepod concentration (ANOVA, $F=12.225$, $p<0.0001$). The stabilization of this rate was not

observed (Fig. 1B). The largest ingestion rate (185 ± 68.8 copepod larva⁻¹ day⁻¹) was observed at 13 copepod ml⁻¹. In the control using *Artemia* nauplii the ingestion rate was 85.5 ± 45 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹. The larval survival was 80% at 5 copepod ml⁻¹ and in the other treatments and control using *Artemia* nauplii it varied from 90 to 100%.

During postlarva 3, the ingestion rate significantly increased with copepod concentration (ANOVA, $F=4.433$, $p=0.0105$), although its stabilization occurred from 10 copepod ml⁻¹ onwards with a general mean value of 229 ± 45 copepod larva⁻¹ day⁻¹ (Fig. 1C). In the control using *Artemia* nauplii the ingestion rate was 115 ± 72 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹. In all treatments and controls the larval survival was 100%.

The stabilization of the ingestion rate during postlarva 5 was reached from 20 copepod ml⁻¹ onwards with a general mean value of 342.8 ± 98 copepod larva⁻¹ day⁻¹ (Fig.1D), although at 34 copepod ml⁻¹ the ingestion rate had an unexpected significant decrease (ANOVA, $F=6.010$, $p=0.0031$). In the control using *Artemia* nauplii the ingestion rate was 315 ± 137 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹. The larval survival varied from 90 to 100 %.

The ingestion rate during postlarva 7 decreased significantly with copepod concentrations (ANOVA, $F=13.802$, $p=0.0001$). The ingestion rate between concentration 17 and 24 copepod/ml was not significantly different with a mean of 293 ± 45 copepod larva⁻¹ day⁻¹ (Fig. 1E). The ingestion rate in *Artemia* control was 510.2 ± 150 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹. The larval survival varied from 90 to 100 %.

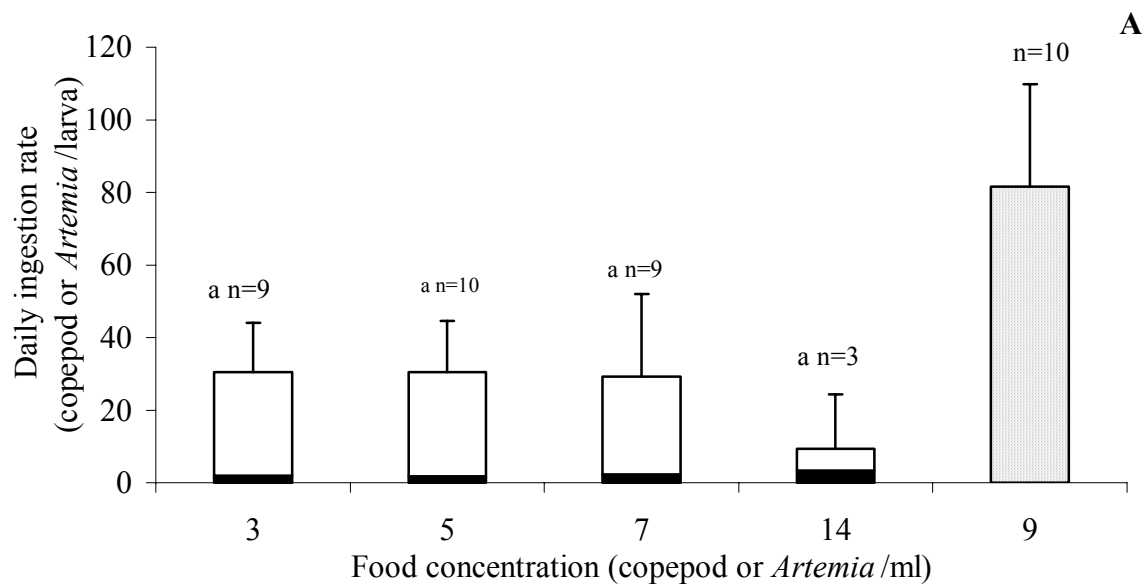


Fig 1. Daily ingestion rate of *L. vannamei* larvae during stages mysis 3 (A), postlarva 1 (B), 3 (C), 5 (D) and 7 (E) fed on different copepod *T. biminiensis* offspring concentrations, in experiments using flat bottom flasks without aeration. Equal letters indicate that ingestion rates did not differ significantly (ANOVA and Tukey, $p > 0.05$). *T. biminiensis* nauplii (■) and copepodites (□) and *Artemia* nauplii (◐) consumed. n = number of replicates.

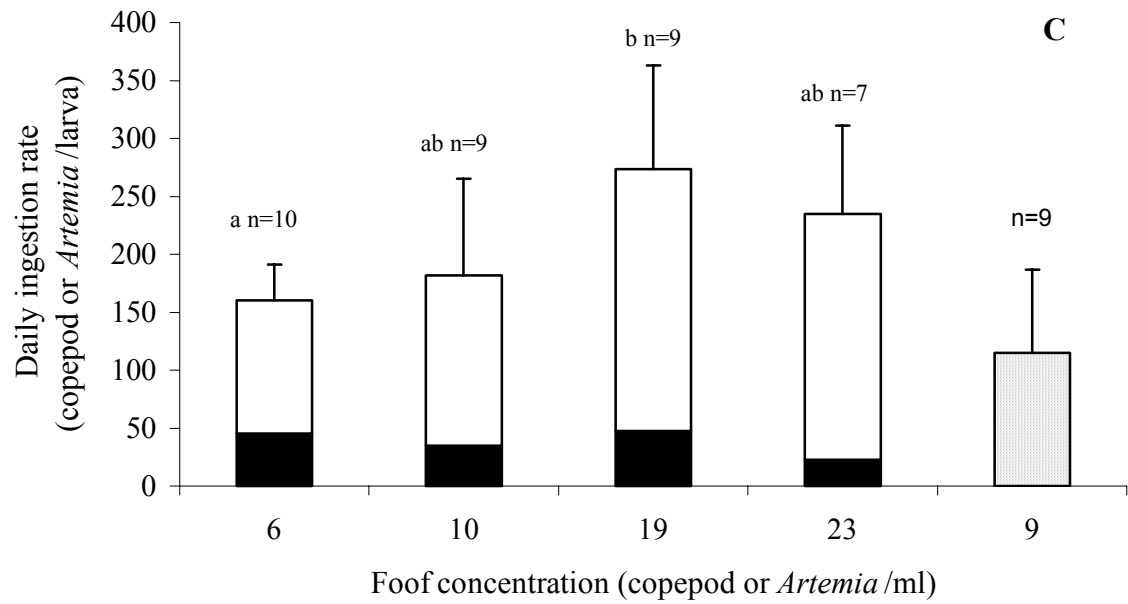
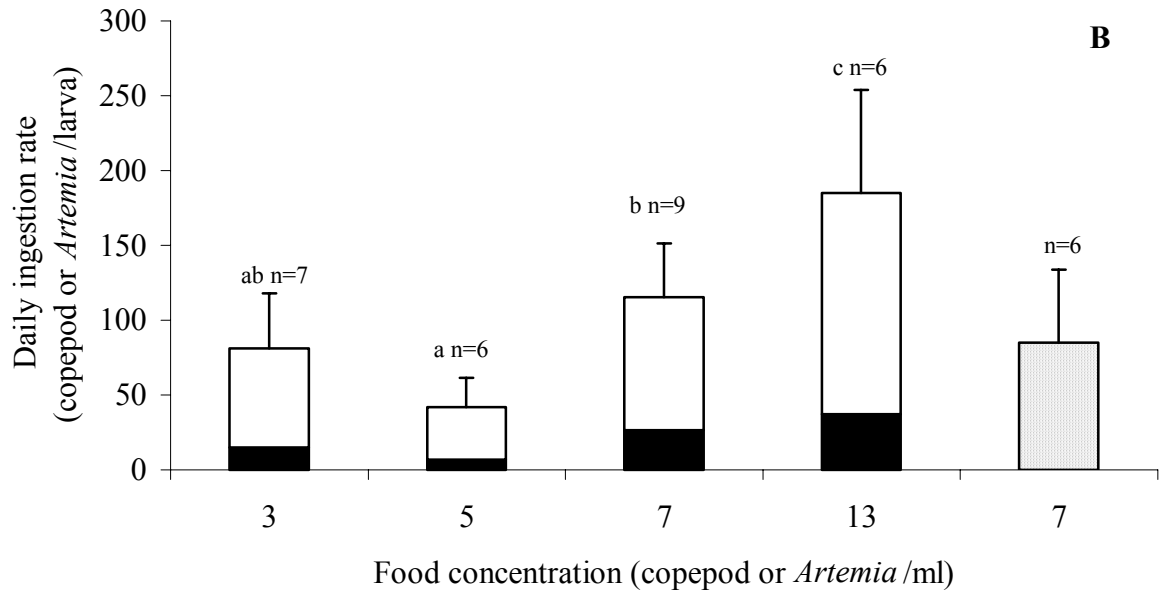


Fig. 1 (continued).

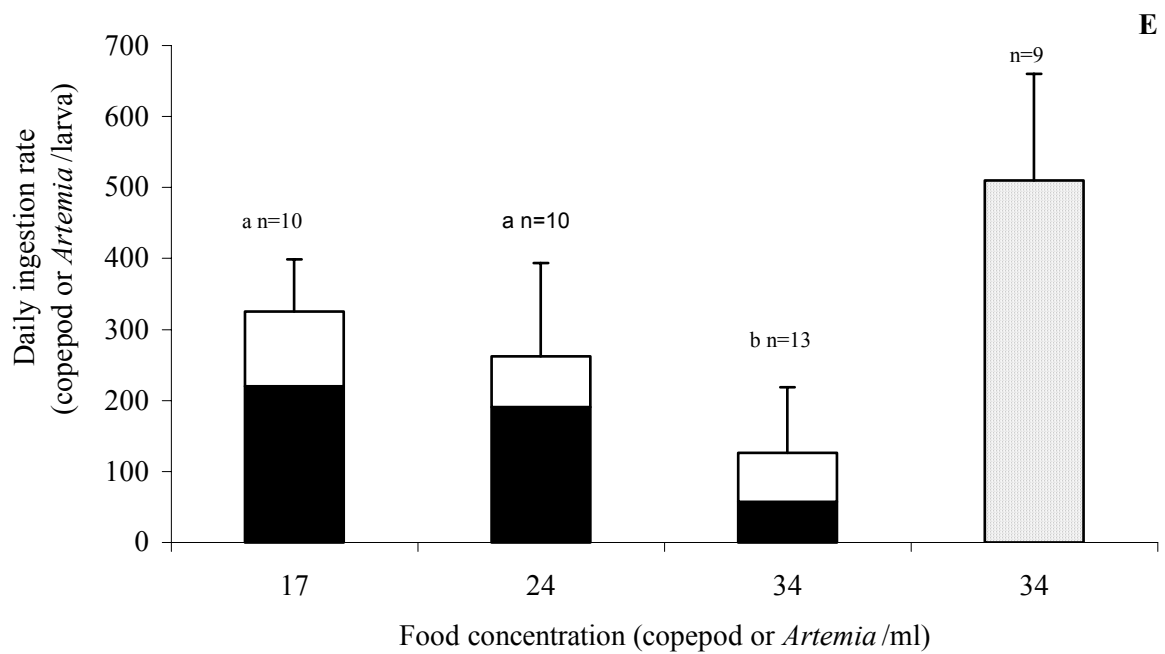
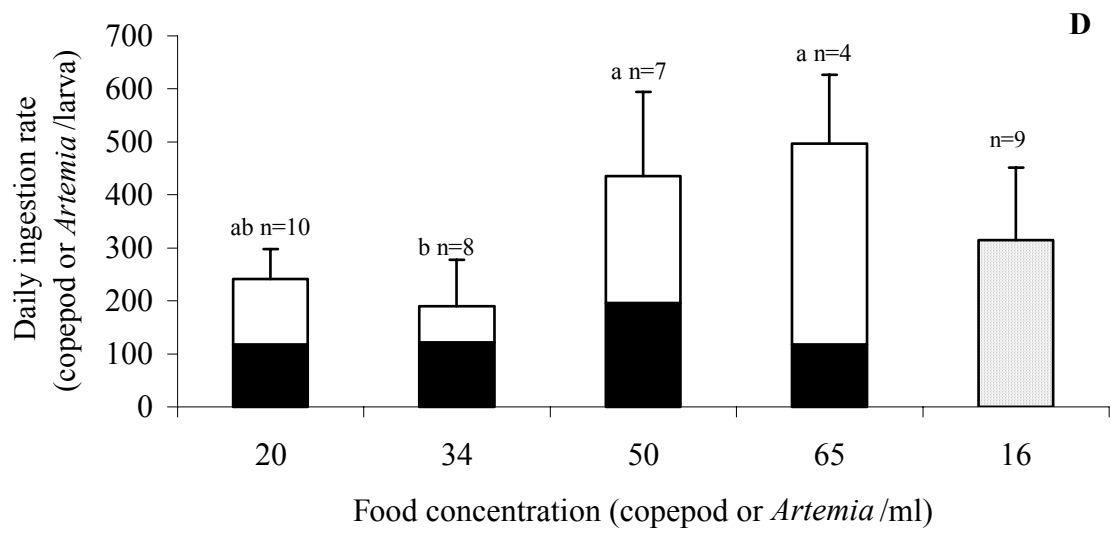


Fig. 1 (continued).

2. Experiments using conic bottom flasks with aeration

During mysis 2, the ingestion rate was not significantly different between 5 and 8 copepod ml^{-1} (ANOVA, $F=1.787$, $p=0.2093$) and the mean value was 56.7 ± 9 copepod $\text{larva}^{-1} \text{day}^{-1}$ (Fig. 2A). At 12 and 16 copepod ml^{-1} the ingestion of copepods did not occur. In control using *Artemia* nauplii the ingestion rate was 179.88 ± 153.7 *Artemia* $\text{larva}^{-1} \text{day}^{-1}$. In treatments using copepod, larval survival varied from 86.6 to 93.3 %, while in control using *Artemia* nauplii it was 100%.

During mysis 3, the ingestion rate was not significantly different among copepod concentrations (Kruskall-Wallis, $H=1.0471$, $p=0.7899$), and mean ingestion rate was 188.5 ± 203 copepod $\text{larva}^{-1} \text{day}^{-1}$ (Fig. 2B). The larval survival was 66.5% at 20 copepod ml^{-1} , while in the other treatments it varied from 87 to 95%. In the control using *Artemia* nauplii, the ingestion rate was 18.8 ± 22 *Artemia* $\text{larva}^{-1} \text{day}^{-1}$, while the larval survival was 100%.

The *Artemia* nauplii ingestion rate during postlarva 7 was $963 \pm 1\ 88$ *Artemia* $\text{larva}^{-1} \text{day}^{-1}$, while the larval survival was 90%.

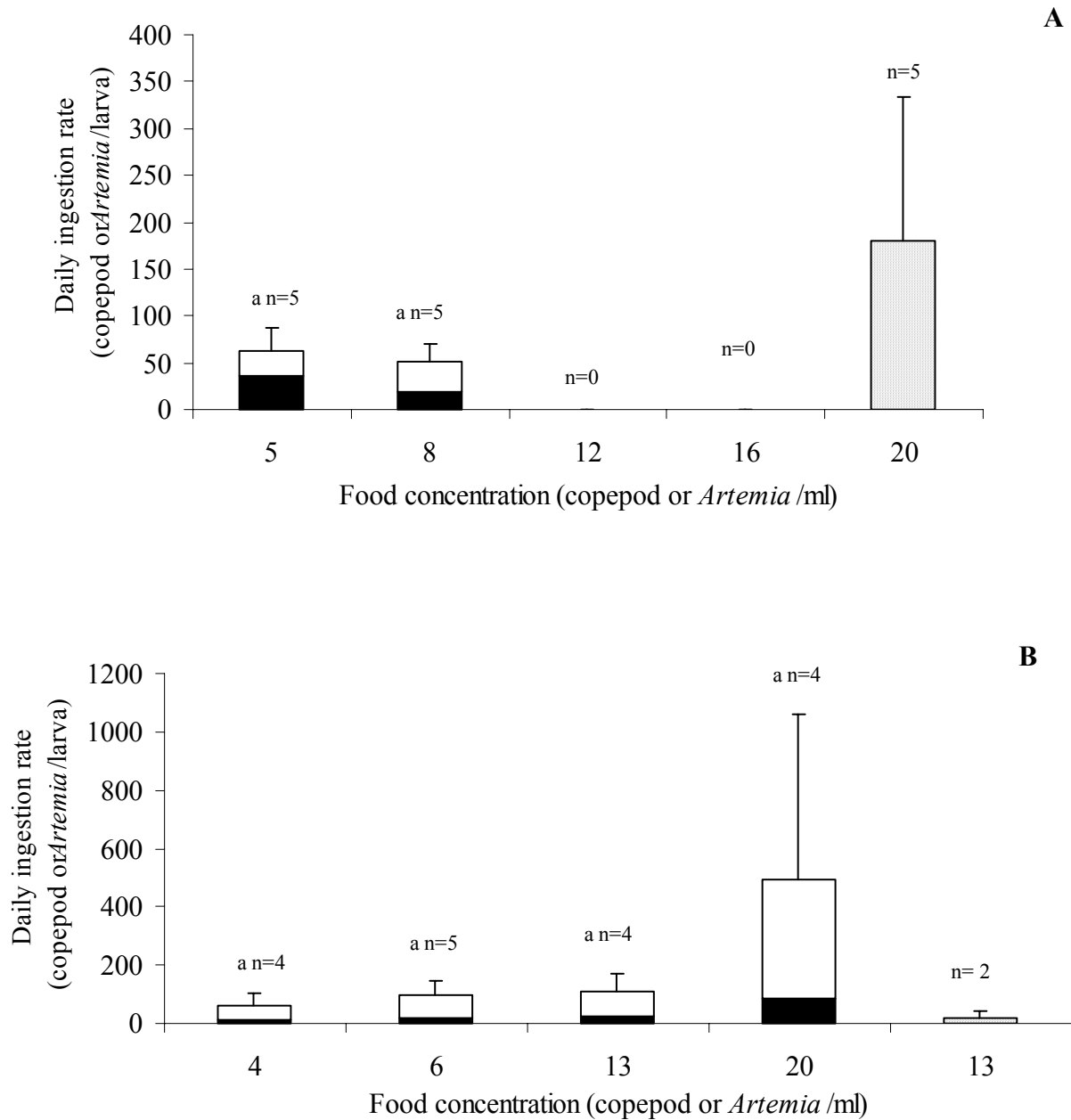


Fig 2. Daily ingestion rate of *L. vannamei* larvae during stages mysis 2 (A) and 3 (B) fed on different copepod *T. biminiensis* offspring concentrations, in experiments using conic bottom flasks with aeration. Equal letters indicate that ingestion rates do not differ significantly (ANOVA or Kruskal-Wallis and Tukey test $p > 0.05$). *T. biminiensis* nauplii (■) and copepodites (□) and *Artemia* nauplii (◐) consumed. n = number of replicates.

3. Relationship between ingestion rate and larval development

When *L.vannamei* larvae were fed on copepod offspring, the ingestion rate initially increased with larval development but from postlarva 5 stage onwards it was stable. When they fed on *Artemia* nauplii, ingestion rate increased exponentially with larval development. From postlarva 1 to 3 the values of copepod ingestion rates were greater than *Artemia* ingestion rates, but during postlarva 7 the *Artemia* ingestion rate was greater than the copepod ingestion rate (Fig. 3).

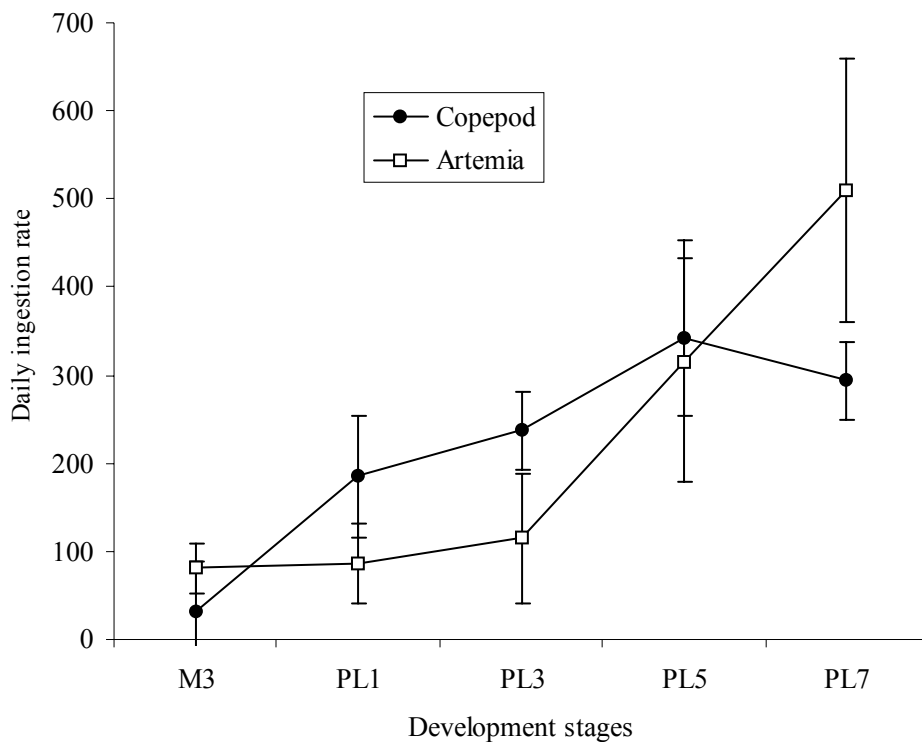


Fig 3. Variation of daily ingestion rate (number of prey.larva⁻¹.day⁻¹) of *L. vannamei* fed on copepod *Tisbe biminiensis* offspring (●) and on *Artemia* nauplii (□) as a function of larval development.

Discussion

Numerous studies used *Artemia* nauplii as animal food in larval peneid cultures. Larval peneid started to ingest *Artemia* nauplii at mysis stage at concentrations varying from 5 *Artemia* ml⁻¹ for *Penaeus marginatus*, *Metapenaeus ensi* (Golakriahnan, 1976; Chu and Shing, 1986; Emmerson, 1984) to 15-18 *Artemia* ml⁻¹ for *Penaeus kerathurus* (Yúfera *et al.*, 1984).

The ingestion rate of *L. vannamei* larvae fed on *Artemia* nauplii increased with larval development between mysis and postlarva 7 stages. The low ingestion rate of mysis 3 fed on *Artemia* in the experiment using conic bottom flasks with aeration may be due to low temperature of the cultivation room (25 °C) or other experimental problem. The ingestion rate of *L. vannamei* fed on *Artemia* nauplii in the present study was similar to those observed for the shrimp *P. kerathurus* in mysis and postlarvae 1-3 (Yúfera *et al.*, 1984). This fact can be explained by similar length for mysis (3-3,5 mm) and postlarvae 1-3 (4-5 mm) of *L. vannamei* and *P. kerathurus* (Yúfera *et al.*, 1984). However, the ingestion rate of *M. ensi* at 10-20 *Artemia* ml⁻¹ concentrations was lower (10 to 80 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹) than that found to *L. vannamei* although similar length (Chu and Shing, 1986).

Comparing with other studies with peneid shrimp, the *Artemia* ingestion rates of *L. vannamei* larvae was lower. Golakriahnan (1976) measured a ingestion rate of 200-500 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹ for *Penaeus marginatus* in mysis. Emmerson (1984) reported an ingestion rate of 187 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹ from protozoa 1 to postlarva 1 of the shrimp *Penaeus indicus*. The variation of ingestion rates can be explained by differences on prey concentration, larval size and culture regime. For example, in this study a larger ingestion rate of postlarva stage 7 was observed using conic bottom flasks with aeration (963.0 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹) than using flat bottom flask without aeration (510.2 *Artemia* larva⁻¹ day⁻¹), at similar food concentrations. This fact may be explained by greater availability of *Artemia* nauplii due to food suspension promoted by aeration.

The main objective of this study was to determine the best copepod *T. biminiensis* offspring concentration to feed *L. vannamei* larvae. The best food concentration is considered to be the minimum food concentration that results in the stabilization of ingestion rates. This knowledge is essential to future experiments testing the

performance of this animal live food as a potential substitute of *Artemia* nauplii in the development and growth of these larvae. In literature, data about copepods as live food for peneid larvae are lacking.

The copepods were not consumed by the mysis 2 in the experiment using flat bottom flasks and larval survival decreased with copepod concentration. However, in the other type of experiment, mysis 2 consumed copepods at 5 and 8 copepod.ml⁻¹, but not at higher copepod concentrations. It may be explained by contamination of the culture with detritus that always accompany the offspring of copepod *Tisbe biminiensis*. In copepod *Acartia* ssp. culture, detritus was also observed with eggs and nauplii. Thus, Schipp *et al.* (1999) did not indicate the use of these nauplii and eggs for feeding fish larvae. Golakriahnan (1976) noted that high concentrations of *Artemia* nauplii caused reduction in larval survival of *Penaeus marginatus*, due to the severe fouling of tanks.

On the other hand, mysis 3 ingested copepods in both types of experiments but ingestion rate was smaller in copepod diet than in *Artemia* one. It can be explained by the larval feeding behavior, once decapod larvae do not have specifically orientation to capture their prey. They depend on the encounter with the prey in order to feed (Kurmary *et al.*, 1989, 1990). For feeding, *L. vannamei* larvae move their appendices, creating a current of water towards the mouth to capture the prey (personal observation). As harpacticoid copepods are benthic, they tend to stay on the walls and the bottom of the cultivation recipients, and they are less likely to be encountered by the shrimp larvae than *Artemia* nauplii which are planktonic. The copepod offspring is probably more adequate only as a food complement for the *L. vannamei* larvae during mysis stages. The best offspring concentration to feed mysis 2 and 3 was about 5 copepod ml⁻¹.

The rotifer *Brachionus plicatilis* is another live food that has been tested for culture of peneid larvae. The rotifer is more adequate as a food complement from protozoa 2 to mysis 3 at a recommended concentration varying from 10 to 40 rotifer.ml⁻¹ (Ermerson, 1984; Samocha *et al.*, 1989). These concentration values are larger than the registered for copepods in this study, probably due to rotifer smaller size and deficiency of certain essential fatty acids (Rhodes and Boyd, 2005). While the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., is a good source of essential fatty acids (Nanton and Castell, 1998), mostly the eicosapentaenoic acid 20:5n3 and docosahexaenoic acid 22:6n3 are important for fish and crustacean growth and development (Feeger, 2005).

The best copepod offspring concentration to feed postlarva 3 was 10 copepod ml⁻¹. Although the ingestion rate in experiments testing postlarvae 1 did not attain the

stabilization, it can be suggested that 10 copepod ml⁻¹ is also the best concentration, once the highest ingestion rate was reached at 13 copepod ml⁻¹. Considering postlarva 5 and 7 the best offspring concentration was probably 20 copepod ml⁻¹, although no inferior concentration was tested for these stages.

The postlarvae 1 and 3 ingested more copepod than *Artemia* nauplii. It may be explained by the sizes of nauplii (about 100 µm) and copepodite 3 (about 300 µm) of *T. biminiensis* (Pinto *et al.*, 2001; Araújo-Castro and Souza-Santos, 2005) compared to the larger length of *Artemia* nauplii (300 µm) (Lavens and Sorgellos, 1996). In spite of that, the inverse was verified at postlarva 7 and suggested that *L. vannamei* larvae from postlarva 7 onward needs larger preys to supply their daily nutritional demands.

Even if it was not an initial objective of this study, both types of experiments could be compared. The experiment type using conic bottom flasks with aeration was more efficient once it favoured copepod ingestion of mysis 2 and 3 and *Artemia* ingestion of postlarvae 7, although it represented more technical work.

In conclusion, copepods will be more adequate as a complement live food for *L. vannamei* larvae in mysis. The best copepod offspring concentration to feed mysis was about 5 copepod ml⁻¹. In postlarval stages, copepods were consumed more efficiently by larvae, as both are benthic. Moreover, it was observed an increase in consumption of copepod with larval development, which indicates improvement in the efficiency of copepods' capture and ingestion by larvae. The best offspring copepod concentration to feed postlarva 1 and 3 was 10 copepod ml⁻¹ and 20 copepod ml⁻¹ to feed postlarva 5 and 7. Thus, the copepod *T. biminiensis* offspring is a potential animal live food to be tested in the *L. vannamei* larviculture.

5. Capítulo III

Substituição de náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *Tisbe biminiensis* na larvicultura do camarão *Litopenaeus vannamei*

Resumo

As larviculturas para fornecer larvas de *Litopenaeus vannamei* de boa qualidade necessitam de uma alimentação adequada. O náuplio de *Artemia* sp. é o alimento mais utilizados no cultivo das larvas, porém não há nenhuma informação sobre o uso dos copépodos como substitutos parciais ou totais dos náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura de *L. vannamei*. Este estudo teve como objetivo comparar a sobrevivência e o crescimento das larvas de *L. vannamei* nutridas com a prole do copépodo *Tisbe biminiensis* e náuplios de *Artemia* sp. Nos testes de desempenho foram usados recipientes de 5 litros com fundo cônico contendo 60 larvas l⁻¹ e recipientes de 1 litro com fundo plano contendo 65 larvas l⁻¹. Os níveis de substituição de náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo foram de 0% (controle), 50% (T1) e 100% (T2). Os recipientes foram mantidos em fotoperíodo 13 h de luz/11 h de escuro, salinidade de 32 ± 1 e temperatura de 28 ± 1°C. Os testes foram finalizados nos estágios de pós-larvas 8 e 9 no primeiro e segundo teste de desempenho, respectivamente. A sobrevivência larval foi muito baixa no primeiro teste e não foi diferente significativamente nos três tratamentos. O comprimento das larvas neste teste não foi significativamente diferente entre os três tratamentos. O peso seco final das larvas no primeiro teste não foi diferente significativamente nos tratamentos T2 e T1 sendo menor no controle. No segundo teste, a sobrevivência larval não foi diferente significativamente no tratamento T2 (40 %) e T1 (37%), sendo menor no controle (18%). Já o comprimento final das larvas foi significativamente maior no tratamento T2 quando comparado aos demais tratamentos, porém o crescimento tanto em peso como em comprimento das larvas durante o teste como um todo não foi significativamente diferente entre os dois tratamentos T1 e T2. Estes resultados ainda são preliminares e o teste deve ser repetido, porém os resultados até o momento indicam que a prole do copépodo *T. biminiensis* pode ser um potencial alimento para substituir os náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura de *L. vannamei*.

Introdução

Na carcinicultura brasileira a espécie *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) é a espécie mais utilizada (Barbieri-Jr & Ostrensky-Neto, 2001). As larviculturas para atender a demanda e fornecer larvas de boa qualidade necessitam de uma alimentação adequada (Yúfera & Rodríguez, 1985). O náuplio de *Artemia* sp. é o alimento animal mais usado nestas larviculturas, entretanto a produção dos cistos de *Artemia* sp. nem sempre atende à demanda crescente pelas aqüiculturas. Mais de 90% da produção de cistos que se encontram disponíveis no mercado internacional provêm de Great Salt Lake (Utah, EUA) (Lavens & Sorgeloos, 1998). Esta produção é resultado das atividades de extração a partir de populações naturais sujeitas tanto às variações ambientais, sobretudo as climáticas, quanto às infecções virais. Desta forma, ocorrem grande variações nas safras anuais promovendo a elevação do preço do cisto no mercado e restrições na importação de cistos provindos de locais contaminados por vírus (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999).

Outros alimentos vêm sendo testados como substitutos parciais ou totais dos náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura, tais como rotíferos, nematódeos, copépodos, cladóceros entre outros (Lavens & Sorgeloos, 1996). Os copépodos harpacticóides do gênero *Tisbe* sp. apresentam características adequadas para o emprego na aqüicultura, uma vez que o cultivo é fácil em virtude da alta fecundidade, curto tempo de geração, limites extremos de tolerância às mudanças ambientais, ampla variedade de alimento e alcance de altas densidades populacionais (Kahan *et al.*, 1981-1982; Fleeger, 2005; Souza-Santos *et al.*, 2006). Além destas características, os copépodos *Tisbe* sp. possuem grande quantidade de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) que são ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 (PUFA) essenciais para peixes e crustáceos marinhos (Nanton & Castell, 1998, Fleeger, 2005). Outro fator que pode favorecer a ingestão dos copépodos *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco 1973 pelas larvas de *L. vannamei* é o fato do tamanho dos copepoditos (Pinto *et al.*, 2001) ser similar ao dos náuplios de *Artemia* sp. (250-300 µm). No capítulo anterior ficou demonstrada a capacidade de ingestão da prole do copépodo *T. biminiensis* pelas larvas de *L. vannamei* entre os estágios de misis 2 e pós-larva 7. Foram também determinados os níveis de concentração ótima do copépodo para esta ingestão.

Este estudo teve como objetivo testar o uso da prole de *T. biminiensis*, composta por náuplios e copepoditos, como dieta substituta dos náuplios de *Artemia* sp. para as larvas de *L. vannamei*. Para comparar a adequação estas dietas foram quantificados o crescimento e a sobrevivência destas larvas.

Material e Métodos

1. Cultivo de microalga

Descrito no capítulo II

2. Cultivo do copépodo

Descrito no capítulo II

3. Primeiro teste de desempenho

Larvas de *Litopenaeus vannamei* foram fornecidas pela empresa Aqualider, situada no município de Ipojuca, Pernambuco, Brasil. Na empresa são produzidos os náuplios de *L. vannamei* e esses são estocados em tanques com aeração constante. A temperatura é em torno de 30 °C, enquanto a salinidade é cerca de 30 para os estágios de náuplio 6 a misis 3 e cerca de 27 para as pós-larvas 1 a 10. A alimentação nesta larvicultura é formada por microalgas, náuplios de *Artemia* sp. congelados e ração inerte (observação pessoal). Os náuplios recém-eclodidos de *Artemia* sp foram submetidos ao congelamento após a eclosão dos cistos e armazenados em freezer.

As larvas nos estágios de misis 1 foram transportadas em sacos plásticos de 5l, com cerca da metade do volume com água do mar. Oxigênio foi acrescentado aos sacos, sendo esses vedados e colocados dentro de isopor para o transporte até o Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco. Ao chegar ao laboratório, as larvas foram estocadas em recipientes plásticos de 5 l com fundo cônico. A água do mar utilizada foi filtrada, em filtros cunco de 25 µm e 3 µm, e a salinidade foi de 32 ± 1 . Cerca de 60% da água dos recipientes foi

renovada diariamente com o auxílio de uma malha de 300 μ m. Antes da troca de água foi coletada uma amostra de água de uma réplica de cada tratamento para estimar a concentração de amônia, que foi determinada baseando-se em Strickland & Parsons (1972) e Grasshoff *et al.* (1983). Os recipientes de cultivo foram submetidos à fotoperíodo de 13h luz/11 h escuro, temperatura de 28° C \pm 1 e aeração constante.

As larvas foram submetidas a três tratamentos de alimentação com 5 réplicas, cada réplica com 300 larvas. Os níveis de substituição de náuplios de *Artemia* sp. pela prole do copépodo *T. biminiensis* foram iguais a: 0 % no controle, 50 % no tratamento 1 (T1) e 100% no tratamento 2 (T2).

Os cistos foram fornecidos pela empresa Aqualider, sendo provenientes da região do Rio Grande do Norte e com a eficiência de eclosão de aproximadamente 200.000 náuplios por grama. Os cistos foram armazenados em geladeira até a eclosão. Para a eclosão, os cistos foram hidratados em água doce por 1 h. Posteriormente, retirou-se a água doce e colocou-se os cistos em becker de vidro contendo 800 ml de água do mar na salinidade de 35. Esse recipiente foi incubado em fotoperíodo de 13h luz/11h escuro, com aeração constante e temperatura de 28° C \pm 1 por 24 h. Após este período de incubação, os náuplios de *Artemia* sp. foram separados e ofertados às larvas de *L. vannamei*. Os cistos restantes foram sifonados e desprezados.

Nos primeiros 5 dias de cultivo, a prole do copépodo e/ou os náuplios de *Artemia* foram ofertados às larvas na densidade de 5 presas ml⁻¹, além da diatomácea *T. fluviatilis* na concentração de 20.000 cel.ml⁻¹. A partir do quinto dia de cultivo foi ofertado 10 presas ml⁻¹ e 10.000 cel.ml⁻¹ da dieta animal e vegetal, respectivamente. As densidades de copépodos oferecidos às larvas nos estágios de misis e pós-larvas estão de acordo com os resultados obtidos no segundo capítulo.

A duração do cultivo foi de 10 dias e a cada dois dias foram retiradas 8 larvas aleatoriamente de três réplicas de cada tratamento. Essas larvas foram coletadas para a medição do comprimento em lupa e a pesagem em balança de precisão (0,0001 g).

As larvas coletadas de cada tratamento foram reunidas em 2 a 4 grupos com 13 a 65 larvas. As larvas foram lavadas em água destilada e posteriormente elas foram postas em envelopes de papel alumínio previamente pesados em balança analítica (0,0001g). Os envelopes foram levados à estufa com temperatura de 60° C por 24 ou 48 h. Após este período os envelopes foram pesados novamente. O peso seco de cada larva foi obtido pela diferença do peso do papel alumínio com e sem larvas, dividido pelo número de larvas.

4. Segundo teste de desempenho

Nesse experimento foram realizados os mesmos três tratamentos descritos no experimento anterior. No entanto, o cultivo foi realizado em recipientes plásticos de fundo plano contendo 1 litro de água do mar e os náuplios de *Artemia* sp. estavam congelados. A empresa Aqualider forneceu os náuplios de *Artemia* sp. já congelados.

Grupos de 65 larvas de *L. vannamei* no estágio de pós-larva 2, foram condicionados em cada recipiente com aeração constante. Cinco réplicas foram utilizadas para cada tratamento. Os recipientes continham água do mar filtrada, em filtros cuno de 25 µm e 3 µm, com salinidade de 32 ± 1 e foram incubados em temperatura de 28-30° C e fotoperíodo de 13 h luz/11 h escuro.

Diariamente cerca de 60% da água dos recipientes foi renovada com o auxílio de uma malha de 300 µm. Antes da troca de água foi coletada uma amostra de água de uma réplica de cada tratamento para estimar a concentração de amônia, segundo descrito no experimento anterior. Foi monitorada diariamente a temperatura, o pH, a salinidade e o oxigênio dissolvido através de termômetro, phmetro (QUIMIS® Q-400A), refratômetro e oxímetro (Instrutherm MO-880), respectivamente.

Ao final da troca de água foi ofertada a dieta animal e vegetal para as larvas. A densidade de alimento animal foi de 10 presas ml⁻¹ entre o 1° e 3° dia de cultivo para todos os tratamentos. Do 4° ao 5° dia a densidade foi de 15 presas ml⁻¹ e do 6° ao 7° dia foi 20 presas ml⁻¹ para os tratamentos T1 e T2. No caso dos controles foi verificada uma alta mortalidade larval no terceiro dia de cultivo, em virtude deste fato a concentração de náuplios de *Artemia* sp. ofertada às larvas foi reduzida para 5 *Artemia* ml⁻¹ até o final do cultivo. Além disso, a diatomácea *T. fluviatilis*, na concentração de 5.000 cel.ml⁻¹, foi ofertada às larvas em todos os tratamentos.

A duração do cultivo foi de 7 dias e a cada dois dias foram retiradas 4 larvas aleatoriamente de cada réplica dos tratamentos T1 e T2. Nos controles não foram coletadas larvas, em virtude da constatação de alta mortalidade larval logo nos primeiros dias de cultivo. As larvas foram coletadas para a medição do comprimento total em lupa e a pesagem em balança de precisão (0,0001 g) conforme descrito no experimento anterior.

5. Análise estatística

A comparação da sobrevivência, do comprimento e do peso seco finais em cada tratamento foi feito utilizando o teste ANOVA, após a verificação da normalidade e homogeneidade de variância dos dados. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado quando os dados não apresentaram os pré-requisitos da análise paramétrica. Quando a ANOVA detectou diferença significativa entre os tratamentos utilizou-se o teste Tukey.

A análise de regressão simples foi usada entre o tempo de desenvolvimento em dias e o comprimento e peso seco das larvas submetidas aos tratamentos T1 e T2. Caso as retas obtidas fossem paralelas, utilizou-se a análise de covariância (ANCOVA) para a comparação destas retas entre os tratamentos. O nível de significância em todos os testes foi igual a 0,05.

Resultados

1. Primeiro teste de desempenho

Durante o período experimental foi verificada uma concentração de amônia (NH_4^+) média de $0,32 \pm 0,35 \mu\text{g l}^{-1}$, $0,58 \pm 0,40 \mu\text{g l}^{-1}$ e $0,30 \pm 0,55 \mu\text{g l}^{-1}$ para os tratamentos controle, T1 e T2, respectivamente (Figura 4). Se observou concentrações máximas de amônia em torno de $1,47 \mu\text{g l}^{-1}$ para o tratamento T2 no 3º dia de cultivo e $1,33 \mu\text{g l}^{-1}$ para o tratamento T1 no 7º dia de cultivo.

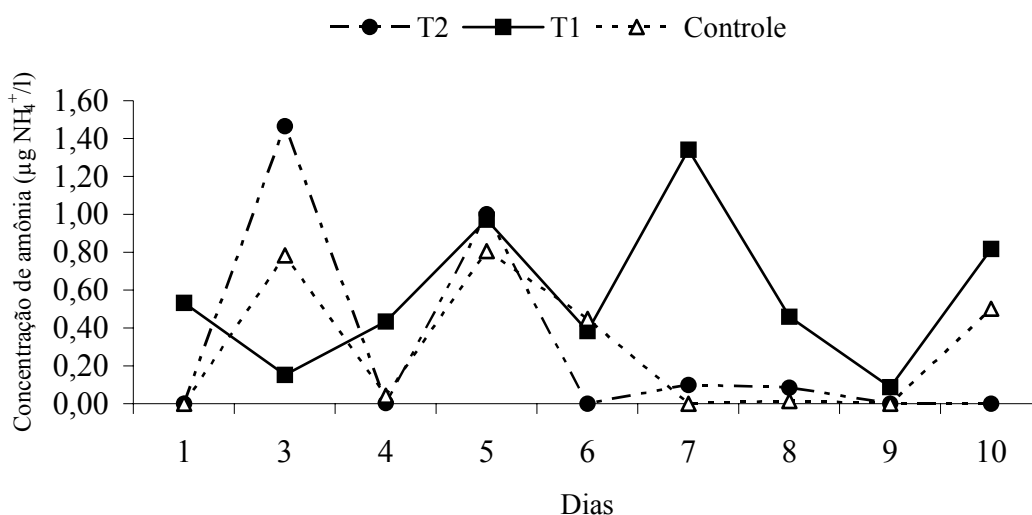


Figura 4. Concentração de amônia (NH_4^+) nos cultivos das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. durante o período de incubação no primeiro teste de desempenho.

No tratamento T1 foi observado o crescimento dos náuplios de *Artemia* sp. até o estágio juvenil. Para verificar se os náuplios de *Artemia* sp. podiam ter se alimentado com a prole do copépodo *T. biminiensis* foi realizado um experimento descrito no anexo.

Após 24 h de incubação, foi constatada uma grande mortalidade das larvas. Desta forma a sobrevivência teve que ser estimada através da contagem das larvas contidas em 150 ml da água do cultivo. A amostra de água foi retirada de 2 recipientes de cada tratamento com o auxílio de um becker de 300 ml, após a homogeneização dos recipientes de cultivo. A sobrevivência média no segundo dia de cultivo foi de $49,9 \pm 6$ %.

Ao final do experimento considerando apenas as larvas sobreviventes após a grande mortalidade inicial, a sobrevivência foi 36,95%, 33,22% e 29,17% nos tratamentos T1, controle e T2, respectivamente (Figura 5). Estes resultados médios de sobrevivência não foram significativamente diferentes (ANOVA; $F=0,48$; $p=0,3640$).

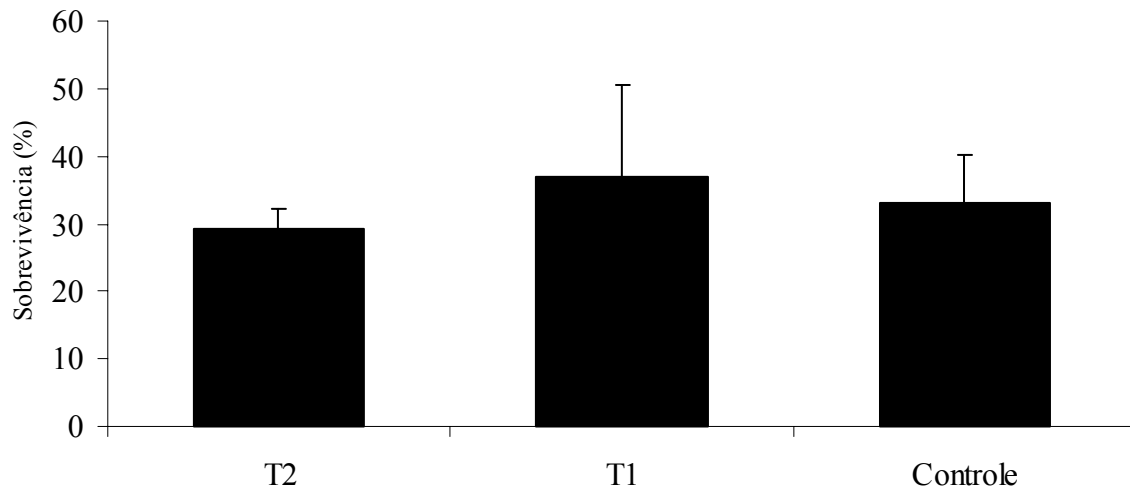


Figura 5. Porcentagem de sobrevivência das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no primeiro teste de desempenho estimada a partir do dia 2º dia de cultivo (n=150 larvas).

No início do teste o comprimento das larvas no estágio de misis 1 foi de $3,1 \pm 0,2$ mm. No final dos mesmos com larvas no estágio de pós-larva 8, o comprimento das larvas entre os três tratamentos não foi significativamente diferente (ANOVA; $F= 1,34$; $p= 0,31$). Os valores médios do comprimento final das larvas foram de $6,2 \pm 0,4$ mm, $6,1 \pm 0,1$ mm e $5,9 \pm 0,4$ mm para os tratamentos com T2, T1 e controle, respectivamente (Figura 6).

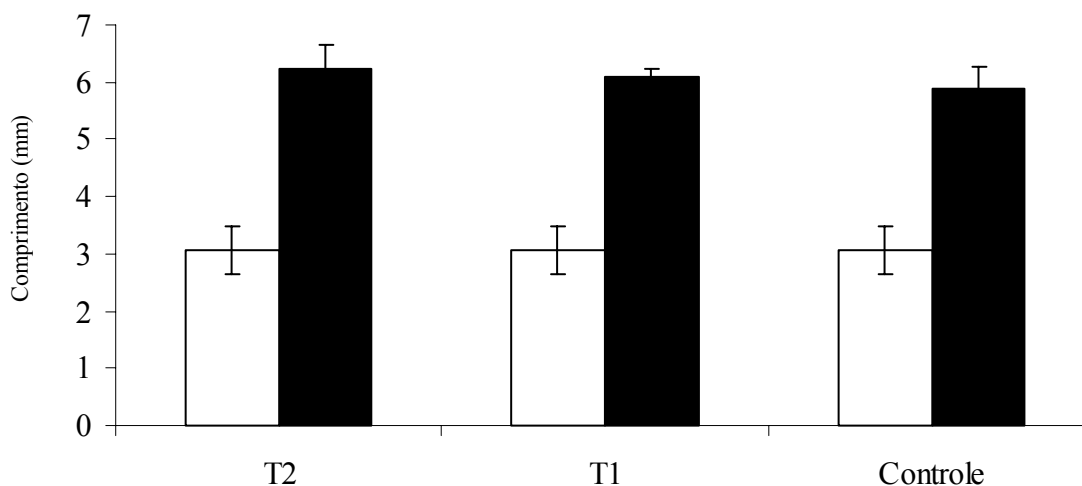


Figura 6. Variação do comprimento (mm) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios inicial de mysis 1 (□, n= 29) e final de pós-larva 8 (■) em função dos tratamentos com 50% (T1) (n= 241) e 100% (T2) (n=116) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. (n=172) no primeiro teste de desempenho.

O peso seco das larvas no estágio de mysis 1 foi de $48 \pm 3 \mu\text{g}$. Ao final do período experimental, foi verificada diferença significativa entre o peso seco das larvas no estágio de pós-larva 8 nos três tratamentos testados (ANOVA; $F=7,214$; $p=0,0162$). No entanto, o teste Tukey não demonstrou diferenças significativas entre o peso das larvas submetidas ao tratamento T2 ($158 \pm 2\mu\text{g}$) e T1 ($150 \pm 17 \mu\text{g}$), sendo este peso menor no tratamento controle ($118 \pm 5\mu\text{g}$) (Figura 7).

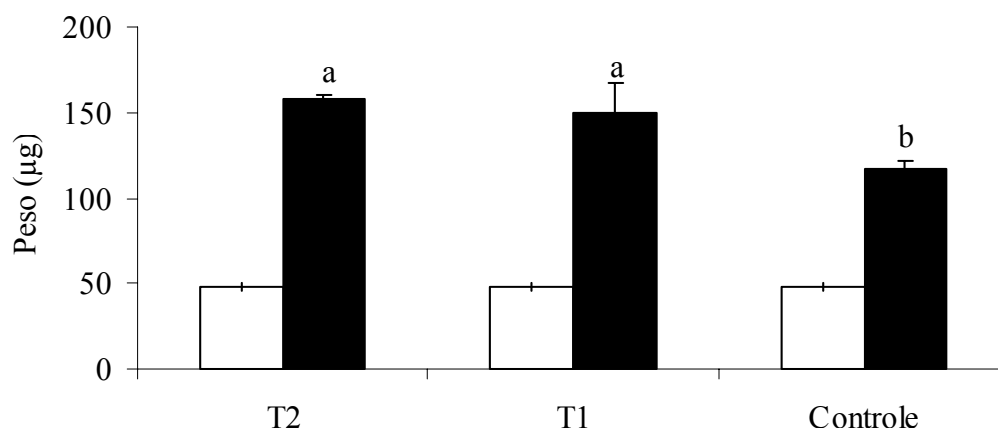


Figura 7. Variação do peso seco (μg) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios inicial de mysis 1 (\square , $n=2$) e final de pós-larva 8 (\blacksquare) em função dos tratamentos com 50% (T1) ($n=4$) e 100% (T2) ($n=3$) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. ($n=4$) no primeiro teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey.

Constatou-se uma relação linear significativa entre o tempo de desenvolvimento em dias e o comprimento das larvas dos camarões nos três tratamentos (Figura 8, Tabela 2). Não foi observada diferença significativa entre as retas obtidas para os três tratamentos (ANCOVA; $F=2,289$; $p=0,1380$).

Tabela 2. Resultado da análise de regressão entre o tempo de desenvolvimento em dias e comprimento (mm) no primeiro teste de desempenho.

Tratamentos	Inclinação	Interseção	R	r^2	F	Gl	P
T2	$0,30 \pm 0,03$	2,68	0,98	96,15	99,84	5	0,00056
Controle	$0,30 \pm 0,01$	2,69	0,99	99,23	517,30	5	0,00002
T1	$0,28 \pm 0,03$	2,52	0,96	93,42	56,75	5	0,00166

\pm erro padrão

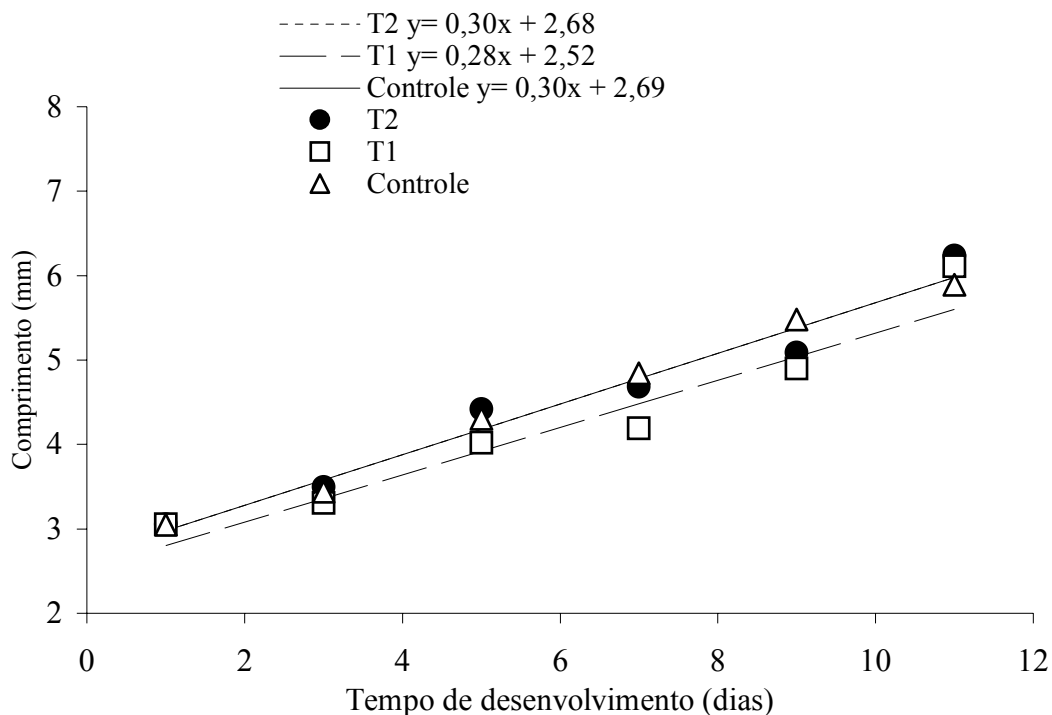


Figura 8. Relação entre o tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o comprimento nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no primeiro teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de mysis 1.

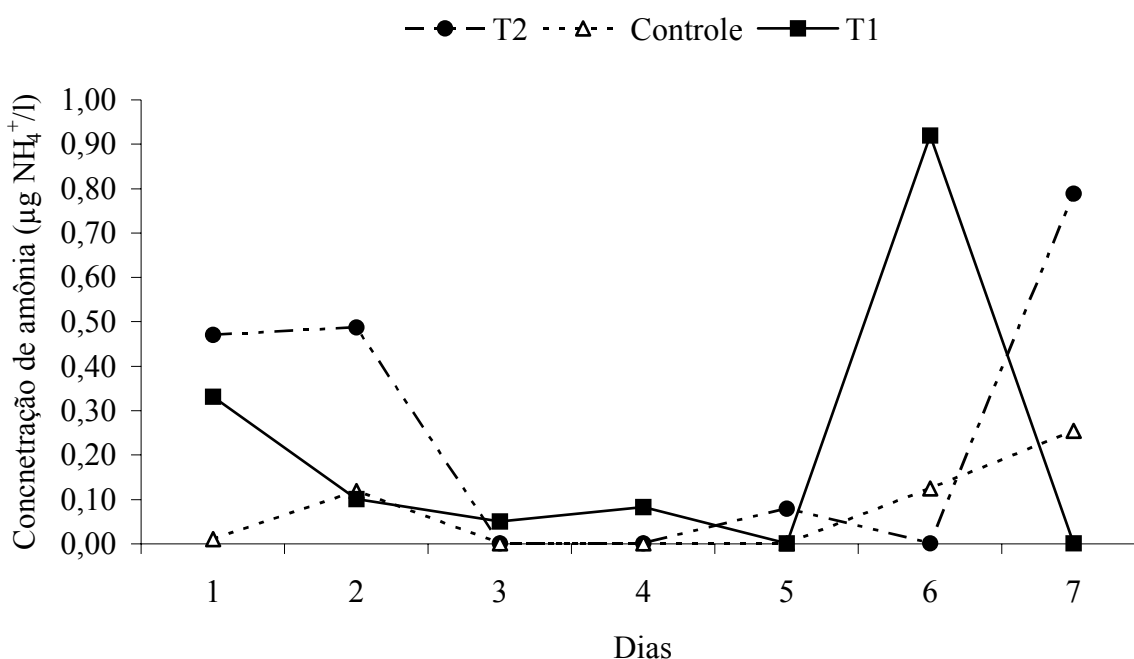
2. Segundo teste de desempenho

Durante o período experimental os valores da temperatura, do pH e da salinidade permaneceram constantes nos três tratamentos (Tabela 3). O nível de amônia (NH_4^+) conservou-se na concentração média de $0,26 \pm 0,32 \mu\text{g l}^{-1}$, $0,21 \pm 0,33 \mu\text{g l}^{-1}$ e $0,07 \pm 0,10 \mu\text{g l}^{-1}$ para o tratamento T2, T1 e controle, respectivamente (Figura 9). Observou-se o maior valor da concentração de amônia no 6º e 7º dia de cultivo nos tratamentos T1 ($0,92 \mu\text{g l}^{-1}$) e T2 ($0,79 \mu\text{g l}^{-1}$), respectivamente. Enquanto no controle, os valores de amônia foram relativamente constantes e inferiores a $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tabela 3. Média da temperatura, salinidade e pH durante o período experimental no segundo teste de desempenho.

Tratamentos	pH	Salinidade	Temperatura °C
T2	8,13 ± 0,18	32 ± 0,7	28 ± 1
Controle	8,01 ± 0,18	31 ± 0,7	28 ± 1
T1	8,05 ± 0,23	31 ± 0,9	28 ± 1

± desvio padrão

**Figura 9.** Concentração de amônia nos cultivos das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados durante o período de incubação no segundo teste de desempenho.

O nível de oxigênio dissolvido diminuiu com o aumento do período de incubação em todos os tratamentos testados (Figura 10). A concentração de oxigênio permaneceu relativamente constante (7,7 ml l⁻¹) até o 3º dia de cultivo e tendeu a cair nos demais dias de cultivo. O menor valor de oxigênio dissolvido (4,4 ml l⁻¹) foi registrado no 6º dia de cultivo em todos os tratamentos. Estes resultados indicam que a água dos cultivos sempre esteve saturada, uma vez que a saturação corresponde a 4,5 ml l⁻¹ nas condições experimentais.

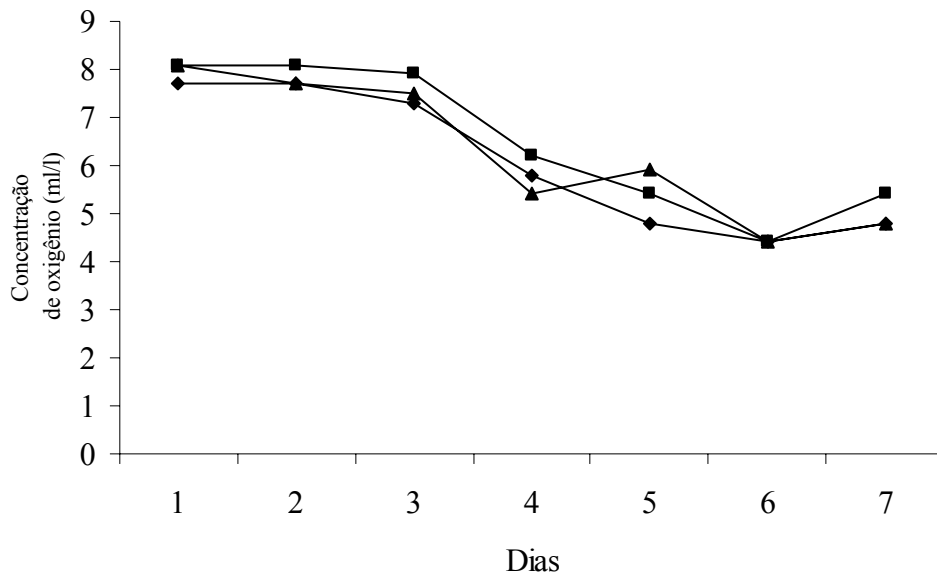


Figura 10. Concentração de oxigênio (ml l^{-1}) durante o período de incubação das larvas de *Litopenaeus vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1)(▲) e 100% (T2)(◆) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle (■) com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados no segundo teste de desempenho.

A sobrevivência final de 18,77% no controle foi significativamente menor (ANOVA; $F=11,9464$; $p=0,0017$) do que a sobrevivência nos tratamentos T2 e T1, igual a 40,39% e 37,54%, respectivamente (Figura 11).

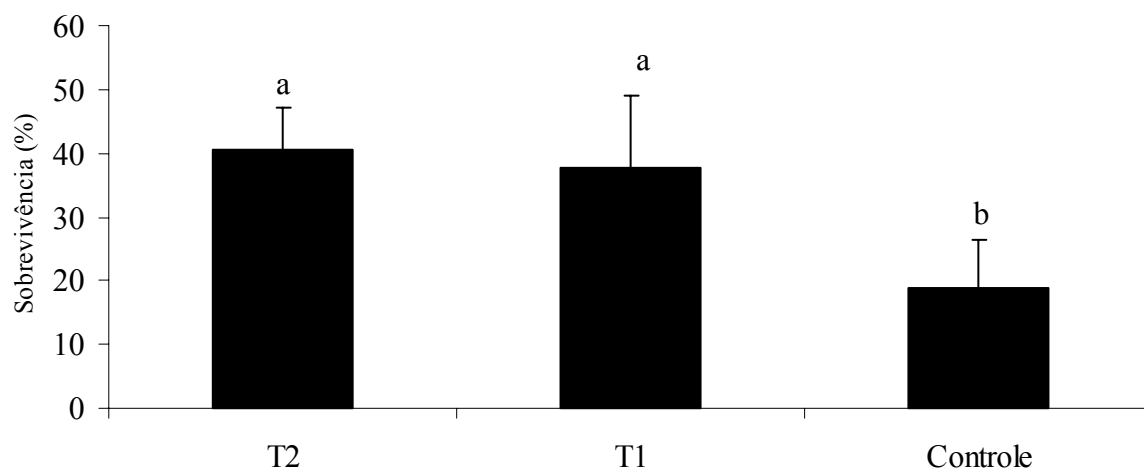


Figura 11. Porcentagem de sobrevivência das larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e o controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey.

O comprimento inicial das larvas no estágio de pós-larva 2 foi $4,68 \pm 0,47$ mm. Ao final do período de incubação, o comprimento das larvas no estágio de pós-larva 9 no tratamento T2 ($7,4 \pm 0,3$ mm) foi significativamente maior do que as larvas submetidas aos demais tratamentos e o comprimento final das larvas nos tratamentos T1 ($7,0 \pm 0,3$ mm) também foi significativamente maior do que as larvas no controle ($6,4 \pm 0,2$ mm) (Figura 12) (ANOVA, $F= 21$ e $p<0,0001$ e Teste de Tukey).

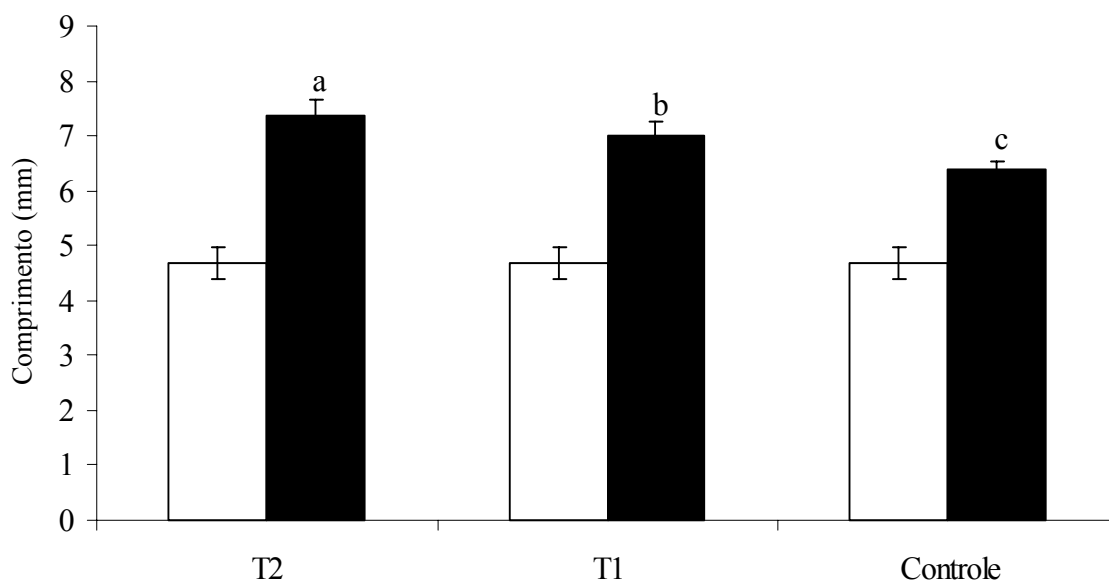


Figura 12. Variação do comprimento (mm) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios de pós-larva 2 (□, n= 80) e pós-larva 9 (■) em função do tratamento com 50% (T1) (n=107) e 100% (T2) (n=117) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados (n=61) no segundo teste de desempenho. As letras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey.

O peso de seco inicial das larvas no estágio de pós-larva 2 foi de $62,5 \pm 10,6 \mu\text{g}$. Nos três tratamentos o peso seco final das larvas no estágio de pós-larva 9 não foi significativamente diferente (ANOVA; $F=0,365$; $p=0,7087$). O valor médio do peso seco final das larvas foi de $234,7 \pm 35,2 \mu\text{g}$ no tratamento T2, $244,5 \pm 17,3 \mu\text{g}$ no controle e $218,2 \pm 25,7 \mu\text{g}$ no tratamento T1 (Figura 13).

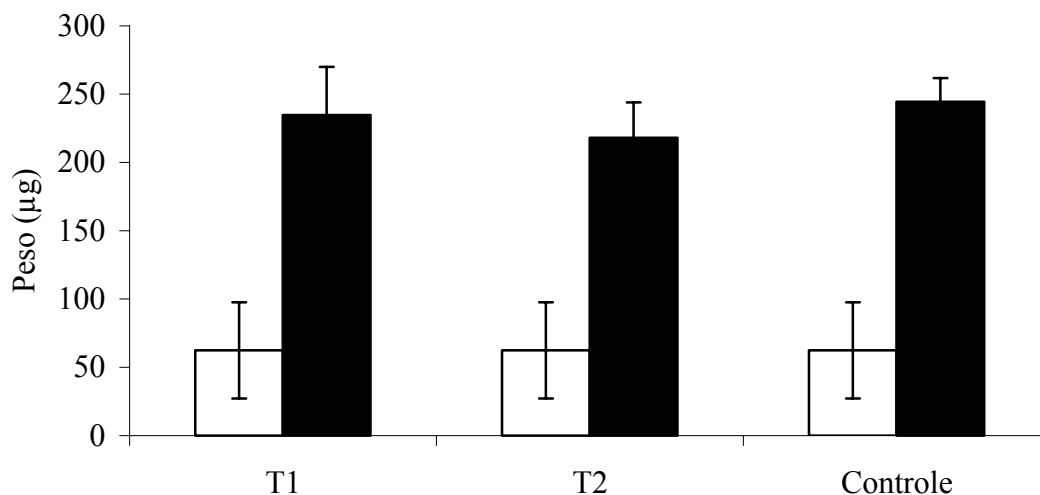


Figura 13. Variação do peso seco (μg) das larvas de *Litopenaeus vannamei* nos estágios de pós-larva 2 (\square , $n=2$) e pós-larva 9 (\blacksquare) em função do tratamento com 50% (T1) ($n=2$) e 100% (T2) ($n=5$) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. congelados pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelados ($n=2$) no segundo teste de desempenho.

Constatou-se uma relação linear significativa entre o tempo de desenvolvimento em dias e o comprimento nos tratamentos T1 e T2 (Figura 14 e Tabela 4). Não foi observada diferença significativa entre as retas obtidas para os dois tratamentos (ANCOVA; $F=1,600$; $p=0,2616$).

Tabela 4. Resultado da análise de regressão entre o tempo de desenvolvimento em dias e o comprimento (mm) e ln do tempo de desenvolvimento em dias e o ln do peso seco (μg) no segundo teste de desempenho.

Comprimento x tempo de desenvolvimento em dias							
Tratamentos	Inclinação	Interseção	R	r^2	F	Gl	P
T2	$0,35 \pm 0,04$	4,11	0,98	97,21	69,61	3	0,01406
T1	$0,31 \pm 0,07$	3,97	0,95	90,36	18,74	3	0,04942
ln peso seco x ln tempo de desenvolvimento em dias							
Tratamentos	Inclinação	Interseção	R	r^2	F	Gl	P
T2	$0,65 \pm 0,12$	4,23	0,97	94,12	32,04	3	0,030
T1	$0,60 \pm 0,12$	4,04	0,96	92,74	25,56	3	0,037

\pm erro padrão

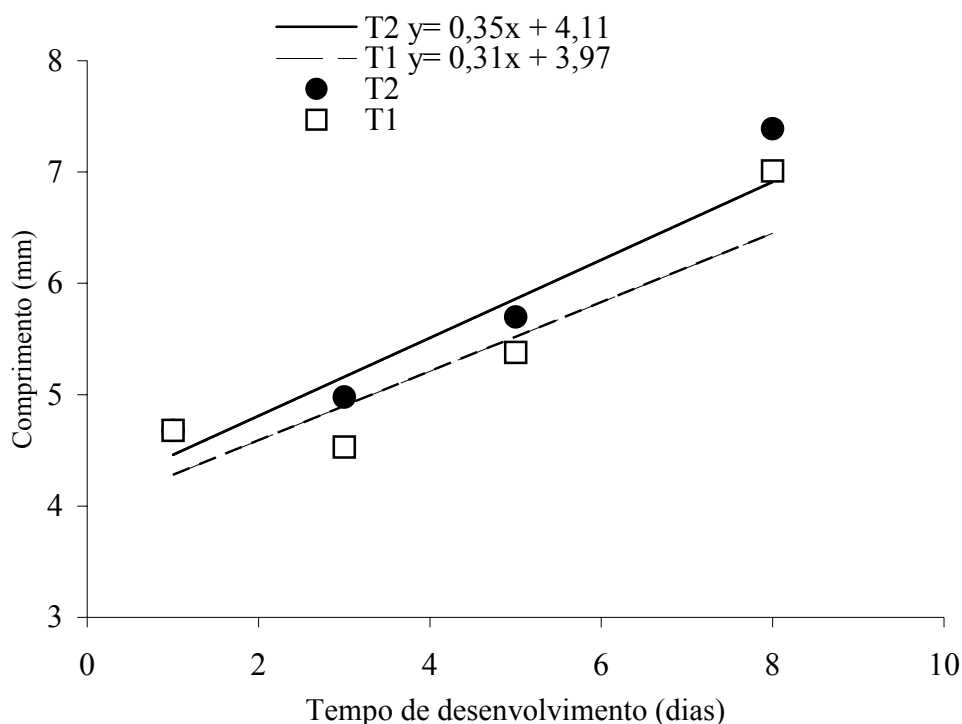


Figura 14. Relação entre o tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o comprimento nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de pós-larva 2.

A análise de regressão simples demonstrou haver uma relação linear entre o logaritmo (ln) do tempo de desenvolvimento em dias e o logaritmo (ln) do peso seco das larvas. Não foi verificada diferença significativa entre duas as retas obtidas nos dois tratamentos (ANCOVA; $F = 4,76$; $p = 0,081$) (Figura 15 e Tabela 4).

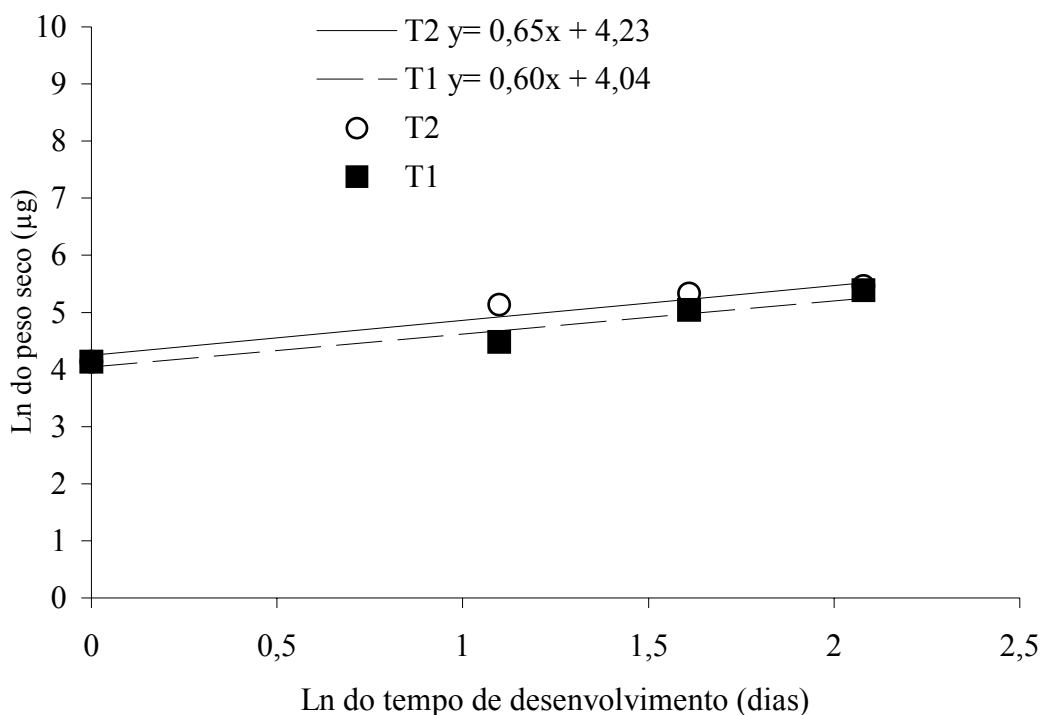


Figura 15. Relação entre o ln do tempo desenvolvimento em dias do camarão *Litopenaeus vannamei* e o ln do peso seco nos tratamentos com 50% (T1) e 100% (T2) de substituição dos náuplios de *Artemia* sp. pelo copépodo *T. biminiensis*, e no controle com apenas náuplios de *Artemia* sp. no segundo teste de desempenho realizado a partir de larvas no estágio de pós-larva 2.

Discussão

Na larvicultura dos camarões peneídeos o crescimento e a sobrevivência das larvas podem ser afetados pelo acúmulo de amônia no tanque de cultivo. Deste modo é importante o monitoramento da qualidade da água durante os estágios larvais (Vinatea & Andreatta, 1997). Os valores de amônia em ambos os testes de desempenho foram bastante inferiores a LC_{50} , igual a 1,3-2,3 mg $NH_4^+ I^{-1}$ para das larvas de *Penaeus japonicus* (Lin *et al.*, 1993) e 1,04-4,70 mg $NH_4^+ I^{-1}$ para das larvas de *Penaeus*

monodon (Chin & Chen, 1987). Neste trabalho a concentração de amônia foi menor ao nível de amônia recomendado para no cultivo de *L. vannamei*, que deve ser inferior a 3 mg. l⁻¹ (Barbieri & Neto, 2001). Este fato pode ser explicado pela troca diária da água nos frascos de cultivo, a capacidade da microalga em absorver vários componentes nitrogenatos como um biofiltro (Langis *et al.*, 1988). Além disso, a aeração no recipiente de cultivo poderia ter volatilizado a amônia (Millamenta *et al.*, 1991).

No primeiro teste de desempenho, a concentração média de amônia foi semelhante entre os tratamentos T2 e controle. Já no tratamento T1 a concentração média de amônia foi ligeiramente superior. Como foi verificado o crescimento da *Artemia* sp. neste tratamento, provavelmente essas contribuíram para uma maior quantidade de amônia nos recipientes de cultivo. No segundo teste de desempenho, o tratamento controle apresentou menor valor médio da concentração de amônia do que nos tratamentos T1 e T2, talvez em virtude da constatação de alta mortalidade das larvas no segundo dia de incubação. Com relação aos outros parâmetros, a temperatura, o pH e a salinidade estão dentro dos valores recomendados para o cultivo de *L. vannamei*.

Vários estudos de cultivo com larvas de peneídeos alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. têm obtido uma sobrevivência em torno de 82-100% (Yufera *et al.*, 1984; Samocha *et al.*, 1989). Entretanto, no primeiro teste de desempenho, após 24 h do início do experimento, foi observada uma mortalidade de 50% das larvas. Este fato provavelmente ocorreu devido à mudança da modalidade de alimentação, visto que as larvas estavam se alimentando na Aqualider com microalga, ração e náuplios de *Artemia* sp. congelados a cada duas horas.

Samocha *et al.* (1989) verificaram uma redução na sobrevivência durante a metamorfose das larvas de *Penaeus semisulcatus* nos estágios de misis devido à mudança da dieta algal para a dieta animal com náuplios de *Artemia* sp. Deste modo, a aclimação é uma prática que deve ser utilizada para favorecer uma melhor adaptação das larvas à mudança na dieta. No cultivo comercial das larvas de *L. vannamei* recomenda-se a oferta de alimento vivo animal e ração a partir do estágio de protozoéa. Outro fato que pode ter favorecido a mortalidade larval foi a realização do transporte das larvas no estágio de misis 1, já que as larvas talvez são muito sensíveis neste estágio.

Também no segundo teste de desempenho, no tratamento com náuplios de *Artemia* sp. congelados foi verificada uma alta mortalidade das pós-larvas, após 48 h do início do cultivo. Provavelmente houve uma proliferação de bactéria em virtude da

utilização como alimento de náuplios de *Artemia* sp. mortos. Além disso, a renovação de apenas 60% da água do cultivo ao dia também propiciava uma maior proliferação das bactérias. Na larvicultura comercial emprega-se a renovação da água dos tanques em torno de 150% ao dia. Além do fato das larvas serem alimentadas com pequenas quantidades de dietas animal e vegetal e ração várias vezes durante o dia (Barbieri & Neto, 2001).

Outro fato que pode ter influenciado a mortalidade das pós-larvas no segundo teste de desempenho foi a pouca disponibilidade de encontro das larvas com os náuplios de *Artemia* sp. congelados. Como as larvas de decápodes não possuem uma orientação específica para a captura de suas presas (Kurmary *et al.*, 1989, 1990) e os náuplios de *Artemia* sp. mortos se localizavam numa área restrita no fundo plano dos recipientes de cultivo, provavelmente as larvas não conseguiram se alimentar. Além disso, o alimento vivo pode ser um estímulo visual para as larvas de camarão.

Ao final do período de cultivo, a sobrevivência larval apesar de baixa foi semelhante em todos os três tratamentos com exceção no controle no segundo teste de desempenho. Esses resultados de sobrevivência foram menores aos registrados (50-68%) para as larvas do camarão *Metapenaeus ensis* (Chu & Shing, 1986) e *Penaeus marginatus* (Gopalakrishnan, 1976) nutridos com náuplios de *Artemia* sp. Além disso, Beard *et al.* (1977) observou uma sobrevivência de 57,8% durante o período de metamorfose das larvas de *Penaeus merguensis*. No entanto, Sangha *et al.* (2000) e Kuban, *et al.* (1985) obtiveram uma sobrevivência de 72% e 95%, respectivamente, para as larvas de *L. vannamei* alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. Apesar desse resultado, Kuban, *et al.* (1985) mencionam que a sobrevivência não é o melhor parâmetro para demonstrar o crescimento das pós-larvas submetidas a diferentes dietas, mas a biomassa é o melhor indicador para testar o valor nutricional da dieta.

Com relação ao comprimento no segundo teste de desempenho, as larvas submetidas ao tratamento T1 e T2 obtiveram maiores valores do que as larvas no tratamento com apenas náuplios de *Artemia* sp. congelado. Este fato pode ser devido à capacidade que os copépodos harpaticóides do gênero *Tisbe* sp. possuem em sintetizar grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados (Nanton & Castell, 1998), principalmente os ácidos graxos da série n-3 (Fleeger, 2005).

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os de Sangha *et al.* (2003), estes autores observaram um maior comprimento das larvas de *L. vannamei* no estágio de pós-larva 1 (4,79 mm) do que o comprimento das larvas no estágio de pós-larva 2

obtidas aqui. Este fato pode ter ocorrido em virtude das larvas cultivadas por Sangha *et al.* (2003) terem sido alimentadas três vezes ao dia, nas concentrações de náuplios *Artemia* sp. foram: 2-3 *Artemia* ml⁻¹ nos estágios de protozoéa 3 a misis 1 e 5-10 *Artemia* ml⁻¹ nos estágios de misis 2 a pós-larva 1.

Comparando-se o parâmetro comprimento das larvas submetidas aos tratamentos T2 e T1, observa-se um melhor desempenho das larvas no primeiro tratamento do que no segundo, apesar da sobrevivência e o peso final terem sido similares entre as dietas em ambos os testes de desempenho. Entretanto, na larvicultura de peneídeos se recomenda a utilização de presas com diferentes tamanhos (Yufera *et al.*, 1984), tais como náuplios de *Artemia* sp. e rotífero *Brachionus plicatilis*. Além disso, a dieta com mistura de alimentos fornece maior diversidade de nutrientes para as larvas.

Com os dados mencionados acima, conclui-se que no segundo teste de desempenho foram obtidos melhores resultados em termo de crescimento do que no primeiro teste. As larvas de *L. vannamei* submetidas aos tratamentos com o copépodo *T. biminiensis*, no segundo teste de desempenho, alcançaram um maior comprimento final em comparação com as larvas nutridas com somente náuplios de *Artemia* sp. No entanto, as curvas de crescimento relacionando o tempo de desenvolvimento, o comprimento e o peso seco durante o período experimental foram semelhantes entre os três dietas testadas. Mais experimentos devem ser realizados para comprovar estes resultados devido a baixa sobrevivência geral obtida neste estudo, porém tudo indica que o copépodo *T. biminiensis* é um alimento potencial para substituir os náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura de *L. vannamei*.

6. Conclusão Geral

Os náuplios e copepoditos de *T. biminiensis* são ingeridos pelas larvas de *L. vannamei* nos estágios de misis e pós-larva. O emprego do copépodo na larvicultura é mais adequado a partir do estágio de misis 3, uma vez que tanto o copépodo quanto as larvas são bentônicas. O aumento da taxa de ingestão das larvas nutridas com copépodo durante o desenvolvimento indica um aumento da eficiência na captura e ingestão do copépodo. A concentração ótima de copépodo foi cerca de 10 copépodo ml⁻¹ para as pós-larvas 1 a 3 e 20 copépodo ml⁻¹ para as pós-larvas 5 a 7. A taxa de ingestão média foi em torno de 57 a 293 copépodo larva⁻¹ dia⁻¹ para os estágios de misis 2 a pós-larva 7, respectivamente.

Com relação ao emprego do copépodo *T. biminiensis* na larvicultura de *L. vannamei*, a sobrevivência larval foi menor do que a recomendada para o cultivo comercial das larvas de *L. vannamei*. Deste modo, mais estudos devem ser realizados para um manejo adequado do cultivo. Embora as larvas nos estágios de misis 1 e pós-larva 2 nutridas com copépodo desenvolveram-se até os estágios de pós-larva 8 e 9, respectivamente. O crescimento das larvas durante o período experimental foi semelhante nos diferentes tratamentos. Entretanto, os melhores resultados em termos de comprimento final foram obtidos pelas larvas alimentadas com copépodo do que com os náuplios de *Artemia* sp. Portanto, o copépodo *T. biminiensis* é um alimento potencial para substituir os náuplios de *Artemia* sp. no cultivo das larvas de *L. vannamei*.

7. Referências Bibliográficas

- ABUBAKR, M. A.; JONES, D. A. (1992). Functional morphology and ultrastructure of the anterior mid-gut diverticulae of larvae of *Penaeus monodon*, 1798 (Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 62 (2): 143-158.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; MALEJÓN, O., G. H. (1998). Reproducción y larvicultura de peces marinos. I Congresso Sul-Americano de Aqüicultura. X Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarões. II FERIA Tecnológica e Produtos para Aqüicultura. Recife - PE, Brasil. 105p.
- ARAÚJO-CATRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P. (2005). Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluvitalis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* ? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327 (1): 58-69.
- BARBIERI-JR, R. C.; OSTRENSKY-NETO, A. (2001). Camarões marinhos – reprodução, maturação e larvicultura. vol. 1. Viçosa: Ed. Aprenda fácil, 255p.
- BARBIERI-JR, R. C.; OSTRENSKY-NETO, A. (2002). Camarões Marinhos – Engorda. Vol. II. Viçosa: Ed. Aprenda fácil, 370p.
- BARRETO, O. J. S.; CAVALCANTI, D. G. (1997). Enriquecimento de alimentos vivos para alimentação de larvas de organismos marinhos: uma breve revisão. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 24: 139-159.
- BEARD, T. W.; WICKINS, J. F.; ARNSTEIN, D. R. (1977). The breeding and growth of *Penaeus merguensis* de Man in laboratory recirculation systems. *Aquaculture*, 10: 275-289.
- CHIN, T.; CHEN, J. (1987). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 66: 247-253.
- CHU, K. H.; SHING, C. K. (1986). Feeding behavior of the shrimp, *Metapenaeus ensis*, on *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 58: 175-184.
- DALL, W.; HILL, B. J.; ROTHLISBERG, P. C.; STAPLES, D. J. (1990). The biology of the Penaeidae. *Advances in Marine Biology*. London: Academic Press, 489p.
- DHONT, J.; LAVENS, P. 1996. Tank production and use of ongrown *Artemia*. In: Lavens, P. & Sorgellos, P (Eds.) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, p. 164-195.

Lima, L. C. M.

- D'SOUZA, F. M. L.; LONERAGAN, N. R. (1999). Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. *Marine Biology*, 133: 621-633.
- ERMMERSON, W. D. (1980). Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology*, 58: 65-73.
- ERMMERSON, W. D. (1984). Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 38: 201-209.
- EVJEMO, J. O.; OLSEN, Y. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (*T. iso*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242: 273-296.
- FLEEGER, J. W. (2005). The potential to mass-culture Harpacticoid copepods for use as food for larval fish. 11-24p. In: Lee, C S.; Bryen, P. J. O.; Marcus, N. H. (Eds.) *Copepods in aquaculture*. 268p.
- GILBERT, V. S. (1996). Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens, P. & Sorgellos, P (Eds.) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, p 79-105.
- GUILLAUME, J., CECCALDI, J. (2001) Digestive physiology of shrimps. In: Guillaume, J.; Kaushik, S.; Bergot, P. & Mértailier, R. (Eds.) *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*. Springer-Praxis, Cornwall, p 239-263.
- GOMES, L. A. O. (1986). *Cultivo de crustáceos e moluscos*. São Paulo: Ed. Nobel, 226p.
- GOPALAKRISHNAM, K. (1976). Larval rearing of red shimp *Penaeus marginatus* (Crustacea). *Aquaculture*, 9: 145-154.
- GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. (1983). *Methods of seawater analysis* 2nd. rev. extended ed. New York. Verlag. Chemie. 317p.
- GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith & M. H. Chanley (Eds). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, N. Y. p 26-60
- HIRATA, H.; MORI, Y.; WATANABE, M. (1975). Rearing of prawn larvae, *Penaeus japonicus*, fed soy-cake particles and diatoms. *Marine Biology*, 29: 9-13.
- INTRIAGO, P.; JONES, D. A. (1993). Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture*, 133: 115-127.

Lima, L. C. M.

- JONES, D. A.; KANAZAWA, A.; ANDEL, A. S. (1979). Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 17: 33-43.
- JONES, D. A.; KURMALY, K.; ARSHARD, A. (1987). Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64: 133-146.
- JONES, D. A.; YULE, A. B.; HOLLAND, D. L. (1997). Larval nutrition. In: D'Abramo, L. R.; Conklin, D. E. & Akiyama, D. M (Eds.). *Crustacean nutrition*. Louisiana: The World Aquaculture Society. 6v. Cap.1. p 353 – 389.
- KAHAN, D.; UHLIG, G.; SCHWENZER, D.; HOROWITZ, L. (1982). A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. *Aquaculture*, 26: 303-310.
- KUBAN, F. D.; LAWRENCE, A. L.; WILKENFELD, J. S.. (1985). Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. *Aquaculture*, 47: 151-162.
- KURMALY, K.; JONES, A. B. Y.; EAST, J. (1989). Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarval 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture*, 81: 27-45.
- KURMALY, K.; JONES, D. A.; YULE, A. B. (1990). Acceptability and digestion of diets fed to larval stages of *Homarus gammarus* and the role of dietary conditioning Behaviour. *Marine Biology*, 106: 181-190.
- LANGIS, R.; PROULX, D.; DE LA NOUE, J.; COUTURE, P. (1988). Effects of a bacterial biofilm on intensive *Daphnia* culture. *Aquaculture Engineering*, 7: 21-38.
- LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO. Fisheries Technical Paper 3614. Roma, FAO. 295p.
- LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (1998). Present status and prospects of the use of *Artemia* cysts and biomass in shrimp farming. In: *Anais do Aquicultura Brasil'98*. Recife, Vol. I, p 147- 162.
- LE VAY, L.; JONES, D. A.; PUELLO-CRUZ, A. C.; SANGHA, R. S.; NGAMPHONGSAI, C. (2001). Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 128: 623-630.

Lima, L. C. M.

- LIN, H.; THUET, P.; TRILLES, P.; MOUNET-GUILLAUME, R.; CHARMANTIER, G. (1993). Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 117: 591-598.
- LORA-VILCHIS, M. C.; CORDERO-ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D. (2004). Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquaculture Research*, 35: 1086-1091.
- LOYA-JAVELLANA, G. N. (1989). Ingestion saturation and growth responses of *Penaeus monodon* larvae to food density. *Aquaculture*, 81: 329-336.
- MARÍN-MAGÁN, V.; CANAVATE, J. P. (1995). Fluorometric determination of selectivity between live and inert food by *Penaeus japonicus* larvae. *Aquaculture*, 134: 307-311.
- MARTIN, L.; ARENAL, A.; FAJARDO, J.; PIMENTEL, E.; HILDALGO, L.; PACHEGO, M.; GARCI, C.; SANTIESTEBAN, D. (2006). Complete and partial replacement of *Artemia* nauplii by *Moina micrura* during early postlarvae culture of white shrimp (*Litopenaeus schmitti*). *Aquaculture Nutrition*, 12: 89-96.
- MILLAMENA, C.; CASALMIR, C.; SUBOSA, P. (1991). Performance of recirculating systems for prawn hatchery and broodstock maturation tank. *Aquaculture Engineering*, 10: 161-171.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (1999). Instrução Normativa No. 3 de 4 de novembro de 1999. *Diário Oficial da União* 213 Seção I: 43.
- NAEGEL, L. C. A. (1999). Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquaculture Engineering*, 21: 49-59.
- NANTON, D. A.; CASTELL, J. D. (1998). The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163: 251-261.
- NUÑEZ, M.; LODEIROS, C.; DONATO, M.; GRAZIANI, C. (2002). Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquaculture International*, 10: 177 – 187.
- PEDROZA-ISLAS, R.; GALLARDO, P.; VERNON-CARTER, E. J.; GARCÍA-GALANO, T.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; GAXIOLA, G. (2004). Growth,

- survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition*, 10: 167-173.
- PEDRAZZOLI, A.; MOLINA, C.; MONTOYA, N.; TOWNSEND, S.; LEÓN-HING, A.; PAREDES, Y.; CALDERÓN, J. (1998). Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Reviews in Fisheries Science*, 61: 143-151.
- PIÑA, P.; VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; ROBLES, M. (2006). Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquaculture*, 253: 523-530.
- PIÑA, P.; NIEVES, M.; RAMOS-BRITO, L.; CHAVIRA-ORTEGA, C. O.; VOLTOLINA, D. (2005). Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*, 249: 431-437.
- PINTO, C. S. C., SOUZA-SANTOS, L. P., SANTOS, P. J. P. (2001). Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, 198: 253-267.
- RIBEIRO, A. C. B.; SOUZA-SANTOS, L. P.; FILHO, M. A. M.; OLIVEIRA, S. M. (2004). Cultivo em massa do copépodo *Tisbe biminiensis* e sua utilização na larvicultura do *M. rosenbergii*. XIII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Fortaleza-CE. p. 95-104.
- ROBINSON, C. B.; SAMOCHA, T. M.; FOX, J. M.; GANDY, R. L.; MCKEE, D. A. (2005). The use of inert artificial commercial food sources as replacements of traditional live food items in the culture of larval shrimp, *Farfantepenaeus aztecus*. *Aquaculture*, 245: 135-147.
- SAMOCHA, T. M.; UZIEL, N.; BROWDY, C. L. (1989). The effect of feeding two prey organisms, nauplii of *Artemia* and rotifers, *Brachionus plicatilis* (Muller), upon survival and growth of larval marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Aquaculture*, 77: 11 – 19.
- SÁNCHEZ, R. M. (1986). Rearing of mysid stages of *Penaeus vannamei* fed cultured algae of three species. *Aquaculture*, 58: 139-144.
- SCHIPP, G. R.; BOSMANS, J. M. P.; MARSHALL, A. J. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174: 81-88.

Lima, L. C. M.

- SICK, L. V. (1976). Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *Marine Biology*, 35: 69-78.
- SOARES, R.; PEIXOTO, S.; WASIELESKY, W.; D'INCAO, FERNANDO (2006). Effect of different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) postlarvae. *Aquaculture research*, 37: 1413-1418.
- SOUZA-SANTOS, L. P.; PASTOR, J. M. O.; FERREIRA, N. G.; COSTA, W. M., ARAÚJO-CASTRO, C. M.V.; SANTOS, P. J. P. (2006). Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. *Aquaculture Research*, 37: 1516-1523.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. (1972). A practical Handbook of seawater analysis 2nd. ed. Ottawa [s.n]
- TOBIAS-QUINITIO, E.; VILLEGAS, C. T. (1982). Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon* Fabricius larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture*, 25: 253-260.
- VINATEA, L.; ANDREATTA, E. R. (1997). Comparative study of continuous and static water renewal strategies in the larviculture of *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) associated with high stocking densities and different water renewal. *Aquaculture*, 154: 247-259.
- YÚFERA, M.; RODRÍGUEZ, A.; LUBIÁN, L. M. (1984). Zooplankton ingestion and feeding behavior of *Penaeus kerathurus* larvae reared in the laboratory. *Aquaculture*, 42: 217-224.

8. Anexo I

**Can the brine shrimp *Artemia* sp. grow on
the *Tisbe biminiensis* copepod offspring?**

Abstract

Artemia sp. nauplius is the most used live food for rearing shrimp and fish. Thus, there is a great interest of aquaculture in the cultivation techniques of this crustacean. This study investigated the growth and survival of *Artemia* sp. fed on the offspring *Tisbe biminiensis* copepod compared to those fed on the microalgae *Thalassiosira fluviatilis*. *Artemia* nauplii were stocked in vessels containing 500 ml of seawater at 34 ± 1 salinity at a density of 50 ind. l⁻¹. The vessels were maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 13 h light/11 h dark and provides with aeration. The *Artemia* sp. were fed on the microalgae (10.000 cel. ml⁻¹) during the 1st until 4th day. At the 5th day, the *Artemia* sp. were submitted to two diets: the copepod offspring (10 copepod ml⁻¹) and microalgae (20.000 cel. ml⁻¹). At the end of the experiment after 11 days, the final growth and survival of *Artemia* sp. were determined, and compared. The final length of *Artemia* sp. was significantly greater with copepod diet (4.40 ± 0.39 mm) than with microalgae diet (3.80 ± 0.38 mm). The final dry weight did not differ significantly between diets. The mean final dry weight was 177 ± 14 µg to copepod diet and 151.2 ± 40.4 µg to microalgae diet. The results showed that *Artemia* sp. can grow when they feed on the copepod offspring. As conclusion, the *T. biminiensis* copepod offspring is an alternative food for the cultivation of *Artemia* sp.

Introduction

Nauplii and adults of *Artemia* sp. are the most used live food for larval stages of reared crustaceans and fishes. This fact is due to its nutritional value, size and easy technology for stocking cysts as well as the production of nauplii (Gilbert, 1996). During the last decades the natural population of *Artemia* sp. supplied the quiescent cysts for aquaculture purposes. Over-exploitation of the cysts' stocks formed by natural population of *Artemia* sp. may result on a future problem for cysts' supply (Evjemo and Olsen, 1999). Thus, the intensive or extensive *Artemia* sp. cultures must be developed to supply aquacultural demands.

Artemia sp. is a non-selective and particle-filtration feeder. Microalgae is the commonly used food for *Artemia* sp. Some substitutes for microalgae have been used as bacteria (Intriago and Jones, 1993), rice bran, corn bran and soybena pellets lactoserum (Dhont and Lavens, 1996). However, these substitutes for microalgae have are not always has a consistent nutritional value (Naegel, 1999). Harpacticoid copepods are a potential food to be used in the *Artemia* sp. cultures because they have great quantities of essential fatty acids that are important for fish and crustacean growth and development (Feeger, 2005).

This study compared growth and survival of *Artemia* sp. fed on the *Tisbe biminiensis* copepod offspring to those fed only on the microalgae *Thalassiosira fluviatilis*.

Materials and Methods

1. Microalgae culture

Described in the chapter II

2. Copepod culture

The copepod *T. biminiensis* has been reared in laboratory for several generations in 500 ml or 5l vessels with seawater at salinity of 31-33, filtered through 25 μm and 3 μm . Culture was maintained at 29-31 °C, 13 h light/ 11 h dark photoperiod and provided with aeration (Souza-Santos et al., 2006). Copepods were fed on the diatom *Thalassiosira fluviatilis* and commercial fish food (Alcon Basic[®]). Every other day, the seawater was completely changed. The collection of the offspring was carried out with a couple of sieves with 63 μm and 250 μm meshes. The 250 μm sieve retained adult copepods and egg-bearing females, while the 63 μm sieve retained nauplii and copepodites (Souza-Santos and Ribeiro, in preparation), that were used as food for *Artemia* sp.

3. *Artemia* culture

Cysts of *Artemia* sp. were hydrated for 1h in freshwater with aeration. After, the cysts were transferred to a becker with seawater at 37 salinity, at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ provided with aeration for 24 h. *Artemia* nauplii that hatched out were stocked in conic bottom plastic flasks containing 500 ml of seawater at 34 ± 1 salinity at a density of 50 ind. l^{-1} . Ten flasks were used and they were maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 13 h light/11 h dark and provided with aeration.

During the first four days of cultivation, *Artemia* sp. nauplii were fed on the diatom *T. fluviatilis* daily at the concentration of 10.000 cel. ml^{-1} . In the 5th day of cultivation, around 70% of the seawater was renewed and 6 *Artemia* sp. nauplii were collected in each flask in order to be measured initial length and weight. The length was measured under a stereomicroscope. In order to obtained the dry weight, two or three groups of *Artemia* sp. were put in aluminium envelopes, which were previously weighed on an analytical balance (0.0001 g). These envelopes with *Artemia* were then dried at 60 °C for 24h and weighed again.

In the 5th day of cultivation, *Artemia* sp. was submitted to two different diets with 5 replicates each: (1) *Tisbe biminiensis* copepod offspring and (2) diatom *T. fluviatilis*. Every other day, the copepod offspring was offered at density of 10 copepod ml^{-1} , while the diatom was offered daily at density of 20.000 cel. ml^{-1} .

Every other day, about 70% seawater in the experimental flasks was renewed using a 125 μm mesh. At the end of the incubation period of 11 days, *Artemia* sp. survival was observed. The animals were then preserved in formalin 4% v/v for further measure of the length and weight.

4. Statistical analysis

To compare the mean final survival, length and dry weigh of *Artemia* sp. the test Analyzes of Variance (ANOVA) was used, after testing data of normality and variance homogeneity. The non-parametric test of Kruskal-Wallis was used when the data was not normal or variance was not homogenous. The significance level was 0.05 for all tests.

Results

On day 11th, all *Artemia* sp. had metamorphosed into juvenile. The mean survival was 51% in the microalgal diet and 47% in the copepod diet and there was not significant difference between both diets (ANOVA, $F=0.1678$, $p=0.6963$).

At the end of the experiment, the length of *Artemia* sp. was significantly greater in the copepod diet (4.40 ± 0.39 mm) than in the microalgal diet (3.80 ± 0.38 mm) (Kruskal-Wallis, $H= 318.24$, $p=0.01$) (Fig. 1).

The final dry weight had no significant difference between diets (ANOVA, $F=0.695$, $p=0.4739$). The mean final dry weight was 177 ± 13.7 μg to the copepod diet and 151.2 ± 40.4 μg to microalgal diet (Fig. 2).

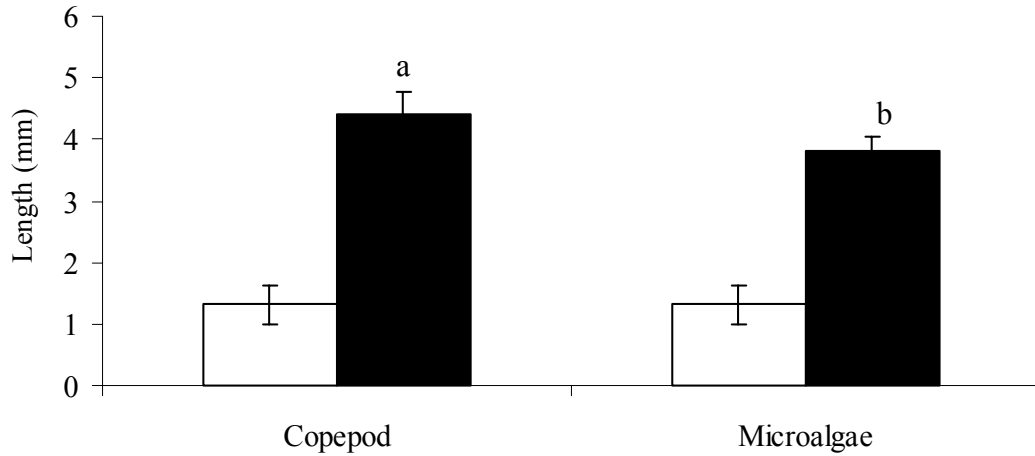


Fig 1. Variation of length (mm) of *Artemia* sp. in the 5th (□, n= 52) and 11th (■) day of cultivation as a function of diet of the microalgae *Thalassiosira fluviatilis* (n=85) and the *Tisbe biminiensis* copepod offspring (n=83). Letters indicate significant differences (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

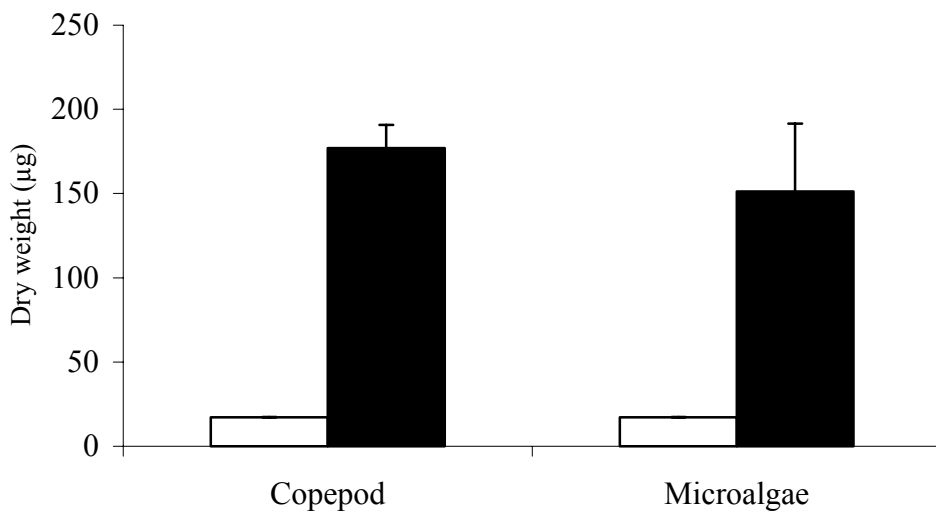


Fig 2. Variation of dry weight (µg) of *Artemia* sp. in the 5th (□, n= 2) and 11^h (■) day of cultivation as a function of diet of the microalgae *Thalassiosira fluviatilis* (n=3) and the *Tisbe biminiensis* copepod offspring (n=2) (ANOVA, $p > 0.05$).

Discussion

The survival obtained in this study after 11 days of cultivation was lower than the survival obtained to the *A. franciscana* which was 75-93% (Lora-Vilchis *et al.*, 2004), to the *A. saline* which was 84-68% (Sick, 1976) and to the *Artemia* sp. which was 80% (Naegel, 1999). In all these studies, *Artemia* sp. were submitted to diets of microalgae. This low survival value can be explained by the low rate of seawater renewal in cultivation (70% every other day), which probably promoted the decrease of seawater quality.

The final length reached by *Artemia* sp. in the copepod diet was greater than in the microalgal diet. This result indicated the high nutritional value of *T. biminiensis* copepod offspring to *Artemia* sp. This high nutritional value could be related to the known capacity of some species of *Tisbe* to synthesize highly unsaturated fatty acids (Nanton and Catell, 1998), which are essential for crustacean growth and development (Fleeger, 2005).

Other studies have reported similar *Artemia* sp. length. For example, *A. saline* fed on *C. sphagnicola*, *N. closterium*, *P. elliptica* and *D. viridis* after 12 days cultivation (Sick, 1976), *Artemia* sp. fed on *Chaetoceros* sp. after 11 days cultivation (Naegel, 1999) and *A. franciscana* fed on *Isochrysis* sp. in the 6th day. However, *A. franciscana* fed on *C. muelleri* reached a larger length of 6 mm (Lora-Vilchis *et al.*, 2004) which can be explained by different culture regimes.

The dry weight of *Artemia* sp. in this study was not significantly different to that reported by Evjemo and Olsen (1999) as 195 µg for *Artemia franciscana* reared for 11 days using *Isochrysis galbana* as food.

According to Dhont and Lavens (1996) *Artemia* sp. preferentially take up and digest alimentary particles with the maximum size of 50 µm. However, in that study the results suggested that *Artemia* sp. ingested the *T. biminiensis* copepod offspring. The offspring copepod is accompanied by fecal pellets, pieces of cast exoskeletons and eggs, that can also be used as food and promote the bacteria growth. In the *Artemia* sp. cultures, bacteria are food complement (Dhont and Lavens, 1996).

In conclusion, *Artemia* sp. grew and developed when fed on *T. biminiensis* copepod offspring, thus it is an alternative food for the cultivation of *Artemia* sp.

References

- DHONT, J.; LAVENS, P. (1996). Tank production and use of ongrown *Artemia*. In: Lavens, P. & Sorgellos, P (Eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture, p.164-195.
- EVJEMO, J. O.; OLSEN, Y. (1999). Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (*T. iso*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 242: 273-296.
- FLEEGER, J. W. (2005). The potential to mass-culture Harpacticoid copepods for use as food for larval fish. In: Lee, C S.; Bryen, P. J. O.; Marcus, N. H. (Eds.) Copepods in aquaculture. p. 11-24..
- GILBERT, V. S. (1996). Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens, P. & Sorgellos, P (Eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture, p. 79-105.
- INTRIAGO, P.; JONES, D. A. (1993). Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture, 133: 115-127.
- LORA-VILCHIS, M. C.; CORDERO-ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA, D. (2004). Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. Aquaculture Research, 35: 1086-1091.
- NAEGEL, L. C. A. (1999). Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. Aquaculture engineering, 21: 49-59.
- NANTON, D. A.; CASTELL, J. C. (1998). The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. Aquaculture, 163: 251-261.
- SICK, L. V. (1976). Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development, and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. Marine Biology, 35: 69-78.
- SOUZA-SANTOS, L. P., PASTOR, J. M. O., FERREIRA, N. G., COSTA, W. M., ARAÚJO-CASTRO, C. M.V. & SANTOS, P. J. P. (2006). Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. Aquaculture Research, 37: 1516-1523.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)