UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

ESMERALDA CHAMORRO LEGARDA

Aquicultura Multitrófica Integrada de camarão, tainha e macroalga em sistema de bioflocos aplicando conceitos de economia circular

Florianópolis
2020

Esmeralda Chamorro Legarda

Aquicultura Multitrófica Integrada de camarão, tainha e macroalga em sistema de bioflocos aplicando conceitos de economia circular

Tese submetida ao Programa de pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Coorientador: Dr. Marco Antonio de Lorenzo

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Legarda, Esmeralda Chamorro
Aquicultura Multitrófica Integrada de camarão, tainha e macroalga em sistema de bioflocos aplicando conceitos de economia circular / Esmeralda Chamorro Legarda ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, coorientador, Marco Antonio de Lorenzo, 2020.
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Mugil sp. 4. Ulva fasciata. 5. Seriola dorsalis. I. Vieira, Felipe do Nascimento. II. Lorenzo, Marco Antonio de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Esmeralda Chamorro Legarda

Aquicultura multitrófica integrada de camarão, tainha e macroalga em sistema de bioflocos aplicando conceitos de economia circular

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Bruno Corrêa da Silva, Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI

Cristhiane Guertler, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Luís Henrique da Silva Poersch, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Aquicultura.

Documento assinado digitalmente
Leila Hayashi
Data: 28/04/2020 13:12:09-0300
CPF: 264.594.018-88

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Documento assinado digitalmente
Felipe do Nascimento Vieira
Data: 24/04/2020 13:19:18-0300
CPF: 035.999.059-24

Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha linda família constituída por mulheres, a minha mãe Lourdes Legarda por me dar a educação base para sair da minha zona de conforto e enfrentar esse bonito desafio, a minhas irmãs Gabriela e Juliana por serem as minhas amigas e por estarem aí sempre que precisei... Juli obrigada pelo desenho artístico da tese.

Agradeço ao meu orientador Felipe pela orientação e amizade. Obrigada mesmo por confiar na minha capacidade e me ajudar sempre que eu precisei. Você é um exemplo de líder e de pessoa.

Agradeço ao meu coorientador Marco pela paciência para trabalhar em cada detalhe, pela amizade construída durante esses anos e por me ensinar que na vida assim como na música, pausa também é nota. E a vida soa melhor se a gente aprende que há valor no silêncio.

Agradeço a Leila Hayashi pelos ensinamentos das macroalgas, e por ser uma pessoa disposta a ouvir e ajudar as pessoas.

A Claudia Machado porque sempre me fez acreditar que tudo é possível, obrigada pela ajuda em cada etapa deste trabalho. Pela ajuda na pesca das tainhas, pela ajuda nas análises de qualidade da água, pelos almoços, jantas, risadas, pela amizade incondicional, por cada momento que não se pode explicar em palavras.

A Isabela Pinheiro porque sempre estava presente quando eu mais precisava.

A Norha por me puxar na corrida e sempre estar disposta a ajudar.

Ao Moisés Poli por estar sempre disposto a ajudar na execução dos experimentos.

Ao Mateus Martins por ajudar sempre nos experimentos e revisar o inglês.

Ao Vitor por fazer o desenho do sistema multi-trófico de camarão e tainha.

A Patriula, Camila, Diego, Ramon, Matheus e Ângela por ajudar no manejo dos experimentos.

Ao Fernando e a equipe da seção de macrolagas do LCM pela ajuda com as primeiras coletas das lvas.

Aos meus colegas Ariane, Jaqueline, Priscila, Gabriela, Mari, Jamilly e Ana pelas conversas.

Ao Ilson, Davi, Diego e Motor pela ajuda na pesca das tainhas, por separar os camarões para cada experimento e por estar sempre dispostos a ajudar.

A Andreia e Salete pelo café e chá sempre quentinho no refeitório e por manter o ambiente sempre limpo e agradável.

Ao Laboratório de Piscicultura Marinha LAPMAR, especialmente ao Caio e Filipe, pela doação das tainhas para o terceiro experimento.

A empresa Presence – Aldi Rações – pela doação da ração Nutripiscis starter 45 para os peixes.

A empresa Ocean Baja Labs Baja Seas, S. A. pela doação dos peixes para executar o experimento.

A CAPES pela bolsa de doutorado.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela bolsa de doutorado sanduíche.

Ao LCM por abrir as portas e ter uma estrutura sempre à disposição.

A PPGAQI pelo apoio durante o curso, especialmente ao Carlito por sempre ter a paciência de atender os meus pedidos e por estar sempre disposto a ajudar na parte administrativa.

Ao NEPAQ, principalmente ao professor Mauricio Laterça, Scheila Pereira, Lúvia de Sá e Gabriel Alves pelas análises hemato-imunológicas das tainhas.

Ao Marcelo Maraschin e a Regina, Caroline e Claudia por abrir o laboratório para realizar as análises de compostos fenólicos, carotenoides, clorofila e ulvana das macroalgas.

Ao *Instituto de Investigaciónes Oceanológicas* da *Universidad Autónoma de Baja California* por me receber especialmente a Dra. Maria Teresa Viana pela supervisão no México.

Ao André Braga e a Vita pela amizade, recepção na sua casa e pela valiosíssima ajuda na minha estadia no doutorado sanduiche em Ensenada, Baja Califórnia, México.

Muito Obrigada aos mexicanos que me receberam muito bem: Aketzali, Andrea, Aurora, Oscar, vou levar sua amizade sempre comigo.

A "polaco-espanhola-mexicana" Arleta Ata pela ajuda na parte de estresse oxidativo com os *jureles*. Além da amizade e correr comigo sempre que precisava!!

Ao Fernando pelas "raites" até minha casa em Ensenada no final dos dias de muito trabalho.

Aos familiares e amigos que não nomeei nestes agradecimentos e fizeram parte de alguma maneira deste processo de aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Na música, pausa também é nota. E a vida soa melhor se a gente aprende que há valor no silêncio. (Autor desconhecido)

RESUMO

A presente tese trata sobre o desenvolvimento de uma aquicultura multitrófica integrada em sistema superintensivo onde todos os produtos e rejeitos tem um valor de mercado. Foram desenvolvidos quatro experimentos, o primeiro avaliou a integração de camarão e tainha em sistema de bioflocos, o segundo avaliou o incremento da densidade de tainha quando integrado ao cultivo de camarão em bioflocos, o terceiro comparou a integração da macroalga (*Ulva fasciata*) ao sistema integrado de camarão e tainha em bioflocos com a melhor densidade de peixes encontrada, finalmente no quarto experimento se avaliaram dietas com diferentes inclusões da macroalga produzida no sistema integrado em bioflocos, como aditivo alimentar para o olhete (*Seriola dorsalis*). De acordo com os resultados destes experimentos, foi observado que a integração de camarão e tainha incrementou a produtividade em 11,9% assim como a retenção de fósforo em 16,8% sem comprometer a saúde dos peixes. Foi encontrado que as altas densidades comprometem o desempenho das tainhas, assim como a capacidade de carga para as tainhas nesse sistema é de 3,7 kg m^{-3}. Da mesma maneira, se encontrou que com até 43 peixes por tanque de 100 L é possível manter a mesma quantidade de fósforo nos efluentes. Além disso se encontrou que com a interação de camarão e tainha, podemos melhorar a eficiência do uso da água em 17%. Observou-se que a integração da *Ulva* melhorou em 5,5 e 7,6% a retenção de nitrogênio e fósforo, respectivamente. Foi demonstrado que é possível incrementar a proteína, fósforo, clorofila e carotenoides das macroalgas no sistema integrado em bioflocos. Finalmente, observou-se que a *Ulva* pode atuar como promotor de crescimento para *S. dorsalis*. Desta maneira, conclui-se que é possível aumentar a produtividade, melhorar o uso dos resíduos do cultivo de camarão como alimento para tainha e fertilizante para *Ulva* sp. em sistema de bioflocos. Além disso, o resíduo do cultivo pode se tornar um produto no mercado contribuindo com a sustentabilidade da aquicultura e adotando o conceito de economia circular.

Palavras-chave: Aquicultura. *Litopenaeus vannamei*. *Mugil* sp. *Ulva fasciata*. *Seriola dorsalis*.

ABSTRACT

The following PhD thesis is about the development of an integrated multi-trophic aquaculture in a super intensive system where all the products and tailings have a market value. Four experiments were developed; the first evaluated the integration of shrimp and mullet into a biofloc system, the second one evaluated the increase of mullet density when integrated with shrimp cultivation in a biofloc system, the third one compared the integration of a seaweed (*Ulva fasciata*) to the shrimp and mullet biofloc system containing the best fish density found in second experiment. Finally, in the fourth experiment, diets with different seaweed inclusions, that were produced in the integrated biofloc system, were evaluated as a food additive for California yellowtail (*Seriola dorsalis*). According to the results of these experiments, it was observed that the integration of shrimp and mullet increased productivity by 11.9% as well as phosphorus recovery by 16.8% without compromising fish health. It was found that the high densities compromise their performance, so the fish yield capacity in this system is 3.7 kg m^{-3}. Also, it was found that up to 43 fish per a 100 L tank can keep the same amount of phosphorus in the effluents, and that with the interaction between shrimp and mullet, we can improve water use efficiency by 17%. It has also been discovered that it is possible to increase the seaweed's protein, phosphorus, chlorophyll and carotenoids in the integrated biofloc system. Finally, it was observed that the *Ulva fasciata* may act as a growth promoter for *S. dorsalis*. Therefore, it is concluded that it is possible to increase productivity, improve the use of shrimp crop residues as mullet feed and fertilizer for *Ulva fasciata*. In a biofloc system, crop residue can become a product offered in the market, contributing to the sustainability of aquaculture and adopting the concept of circular economy.

Keywords: Aquaculture. *Litopenaeus vannamei*. *Mugil* sp. *Ulva fasciata*. *Seriola dorsalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo conceitual de Aquicultura Multitrófica Integrada (AMTI). 25
Figura 2 - Esquema do ciclo de produção do peixe olhete (*Seriola dorsalis*)..... 29
Figure 3 - Flow diagram for experimental units of: (A) a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp), and (B) a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet). Illustration, Vitor Fernandes Silva. 37
Figure 4 - Total nitrogen (A) and phosphorus (B) in grams per experimental unit and percentage in each component after 53 days of cultivation in a integrated biofloc system with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp)..... 47
Figure 5 - A) Nitrogen mass balance where different letters represent significant difference by ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$); B) Phosphorus mass balance where different letters represent significant difference by ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$) in a *Litopenaeus vannamei* and *Mugil curema* integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days. 66
Figura 6 - Desenho esquemático da unidade experimental de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias. Circulação constante entre o tanque de camarão e tainha e semanalmente se diluía 25% da água para o cultivo das macroalgas. 76
Figura 7 - Hematócrito do olhete alimentodos por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta. 103
Figura 8 - Regressão linear da relação n-3/n-6 dos ácidos graxos do filé dorsal dos peixes alimentados por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta. 104

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Physical and chemical variables for water in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 41

Table 2 - Total sludge produced, sludge:biomass ratio, total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 42

Table 3 - Hematological parameters of mullet (*Mugil curema*) cultivated in an integrated system with shrimp in bioflocs (Shrimp+Mullet) for 53 days with reference values reported by authors. RBC: red blood cells, WBC: white blood cells, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. 43

Table 4 - Zootechnical performance of shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 44

Table 5 - Nitrogen and phosphorus recovery for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 45

Table 6 - Nitrogen mass balance for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 46

Table 7 - Phosphorous mass balance for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days. 46

Table 8 - Physical and chemical water quality variables for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days. 61

Table 9 - Total sludge produced, sludge:biomass ratio, total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) for Pacific

white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days. 62
Table 10 - Total inputs of shrimp and fish feed, calcium hydroxide, seawater, freshwater to total biomass ratio and carbon to nitrogen for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days. 62
Table 11 - Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei)* and Mullet (*Mugil curema)* performance in an integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days. 64
Table 12 - Nitrogen and phosphorus recovery in a *Litopenaeus vannamei* and *Mugil curema* integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days. 64
Table 13 - Nitrogen mass balance for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days. 65
Table 14 - Phosphorous mass balance for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days. 67
Tabela 15 - Variáveis físicas, químicas e microbiológicas da água no cultivo integrado em sistema de bioflocos de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* por 55 dias. 81
Tabela 16 - Desempenho animal e algal no sistema integrado de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias. 82
Tabela 17 - Retenção de fósforo e nitrogênio em um cultivo integrado de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias. 82
Tabela 18 - Concentração de nitrogênio, fósforo, clorofila, carotenoides e compostos fenólicos da macroalga *Ulva fasciata* no início e no final do cultivo integrado com camarão e tainha em sistema de bioflocos por 55 dias. 83
Tabela 19 - Ingredientes da formulação (g kg^{-1}) e composição proximal das dietas usadas para alimentar juvenis de *S. dorsalis* contendo diferentes níveis de *Ulva* sp. Os valores estão apresentados em g kg^{-1} em base a material seca. 98
Tabela 20 - Perfil dos principais ácidos graxos e dietas com diferentes níveis de inclusão de farinha de *Ulva fasciata* para o peixe olhete (*Seriola dorsalis*). 99
Tabela 21 - Desempenho zootécnico da *Seriola dorsalis* alimentada por 48 dias com dietas com adição de diferentes níveis de *Ulva* sp. 102

Tabela 22 - Parâmetros hematológicos e da química sanguínea de juvenis de olhete (*Seriola dorsalis*) alimentada por 48 dias com dietas com adição de diferentes níveis de *Ulva* sp. 103
Tabela 23 - Perfil dos principais ácidos graxos do músculo do peixe (*Seriola dorsalis*) alimentados por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMTI Aquicultura Multitrófica Integrada

BFT Tecnologia de Bioflocos

N Nitrogênio

NO_2 Nitrito

NO_3 Nitrato

NR nitrato redutase

P fósforo

RAS Sistema de Recirculação Aquícola

SSF Sólidos Suspensos Fixos

SST Sólidos Suspensos Totais

SSV Sólidos Suspensos Voláteis

TAN Nitrogênio Amoniacal Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
1.1 CULTIVO COM TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT) 19
1.1.1 Histórico 19
1.1.2 Características 19
1.1.3 Bioflocos como fonte de alimento para os organismos de cultivo 21
1.1.4 Infraestrutura necessária 21
1.1.5 Tecnologia sustentável 22
1.1.6 Desafios do sistema 22
1.2 AQUICULTURA MULTITRÓFICA INTEGRADA 23
1.3 TAINHA 25
1.4 MACROALGAS 26
1.4.1 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva* sp. 27
1.5 *Seriola dorsalis* 28
1.6 ECONOMIA CIRCULAR NA AQUICULTURA 29
1.7 OBJETIVOS 30
1.7.1 Objetivo Geral 30
1.7.2 Objetivos Específicos 30
1.8 ESTRUTURA DO TRABALHO 31
2. Artigos científicos 32
2.1 CAPÍTULO I: SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO AQUÍCOLA INTEGRADO DE TAINHA E CAMARÃO USANDO A TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS ... 32
2.1.1 Introduction 34
2.1.2 Materials and methods 35
2.1.2.1 Location 35
2.1.2.2 Biological material 36
2.1.2.3 Experimental units, experimental design and system management 36
2.1.2.4 Water quality 38
2.1.2.5 Sludge produced 38
2.1.2.6 Shrimp and mullet performance 38
2.1.2.7 Nitrogen and phosphorus recovery 39
2.1.2.8 Nitrogen and phosphorus mass balance 39
2.1.2.9 Hematological and immunological parameters 39

2.1.2.10 Statistical analysis 41
2.1.3 Results and Discussion 41
2.1.3.1 Water quality 41
2.1.3.2 Total suspended solids, sludge produced and sludge:biomass ratio 42
2.1.3.3 Hematological and immunological parameters 42
2.1.3.4 Shrimp and mullet performance 43
2.1.3.5 Nitrogen and phosphorus recovery 45
2.1.4 Conclusion 47
2.1.5 Acknowledgments 47
2.1.6 Funding sources 48
2.1.7 References 48
2.2 CAPÍTULO II: CULTIVO DE CAMARÃO EM BIOFLOCOS INTEGRADO COM TAINHA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM 52
2.2.1 Introduction 54
2.2.2 Material and methods 55
2.2.2.1 Location 55
2.2.2.2 Biological material 55
2.2.2.3 Experimental units, experimental design and system management 56
2.2.2.4 Feed management 57
2.2.2.5 Water quality 58
2.2.2.6 Sludge produced 58
2.2.2.7 Water use and resources 58
2.2.2.8 Shrimp and fish performance 59
2.2.2.9 Nitrogen and phosphorus recovery 59
2.2.2.10 Nitrogen and Phosphorus mass balance 60
2.2.2.11 Statistical analysis 60
2.2.3 Results and discussion 60
2.2.3.1 Water quality 60
2.2.3.2 Sludge produced 61
2.2.3.3 Water use and resources 62
2.2.3.4 Mullet and shrimp performance 63
2.2.3.5 Nitrogen and phosphorus recovery 64
2.2.3.6 Nitrogen and phosphorus mass balance 65
2.2.4 Conclusions 67

Acknowledgements **67**
Data Availability Statement **68**
References **68**
2.3 CAPÍTULO III: DESEMPENHO DE *Ulva fasciata* EM UM SISTEMA INTEGRADO DE CAMARÃO E TAINHA EM SISTEMA DE BIOFLOCOS .. 71
2.3.1 Introdução **73**
2.3.2 Material e métodos **74**
2.3.2.1 Localização 74
2.3.2.2 Material biológico 74
2.3.2.3 Desenho experimental 75
2.3.2.4 Unidades Experimentais 75
2.3.2.5 Povoamento 77
2.3.2.6 Alimentação 77
2.3.2.7 Qualidade da água e sólidos 77
2.3.2.8 Microbiologia 78
2.3.2.9 Desempenho do camarão, tainha e macroalga 78
2.3.2.10 Retenção de fósforo e Nitrogênio 79
2.3.2.11 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva fasciata* 79
2.3.2.12 Extração de ulvana 80
2.3.2.13 Análise estatística 80
2.3.3 Resultados **80**
2.3.3.1 Qualidade da água, sólidos e microbiologia 80
2.3.3.2 Desempenho animal e algal 81
2.3.3.3 Retenção de fósforo e nitrogênio 82
2.3.3.4 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva fasciata* 83
2.3.3.5 Produtividade de ulvana 83
2.3.4 Discussão **83**
2.3.4.1 Qualidade da água, sólidos e microbiologia 83
2.3.4.2 Desempenho dos animais e das macroalgas 84
2.3.4.3 Retenção de fósforo e nitrogênio 85
2.3.4.4 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila em *Ulva fasciata* 86
2.3.4.5 Produtividade da ulvana 87
2.3.5 Conclusão **87**
2.3.6 Agradecimentos **87**

2.3.7 Fontes de financiamento ... 87
2.3.8 Referências ... 88
2.4 CAPÍTULO IV: EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DE *Ulva fasciata* NA DIETA PARA A *Seriola dorsalis* SOBRE O CRESCIMENTO E HEMATOLOGIA ... 92
2.4.1 Introdução ... 94
2.4.2 Material e métodos ... 96
2.4.2.1 Material biológico ... 96
2.4.2.2 Localização ... 96
2.4.2.3 Macroalga ... 96
2.4.2.4 Dietas experimentais ... 97
2.4.2.5 Desenho experimental ... 99
2.4.2.6 Manejo e alimentação ... 99
2.4.2.7 Parâmetros zootécnicos ... 100
2.4.2.8 Coletas ... 100
2.4.2.9 Parâmetros hematológicos dos peixes ... 101
2.4.2.10 Análises bromatológicas das dietas e do músculo dos peixes ... 101
2.4.2.11 Análise estatística ... 101
2.4.3 Resultados ... 102
2.4.3.1 Desempenho zootécnico e índices somáticos dos peixes ... 102
2.4.3.2 Hematologia e química sanguínea ... 102
2.4.3.3 Bromatologia do músculo ... 103
2.4.4 Discussão ... 106
2.4.5 Conclusão ... 108
2.4.6 Financiamento ... 108
2.4.7 Agradecimentos ... 108
2.4.8 Referencias ... 108
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS ... 112
4. CONCLUSÃO ... 114
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO ... 115

1. INTRODUÇÃO

1.1 CULTIVO COM TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT)

1.1.1 Histórico

Os primeiros ensaios no sistema de cultivo superintensivo com tecnologia de bioflocos foram nos anos 80's na Polinésia Francesa pelo pesquisador Gerard Cuzon do IFREMER que chamou os bioflocos de "moulinettes" e foram utilizados para manutenção de reprodutores de camarão. Depois disso, nos 90's Yoram Avnimelech de Israel publicou o primeiro reporte falando sobre a manipulação da relação carbono nitrogênio para formação de flocos bacterianos para o controle de nitrogênio inorgânico dos cultivos aquícolas (AVNIMELECH, 1999). Ainda na década de 90, o Waddell Mariculture Center, com grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Steve Hopkins, nos Estados Unidos publicou a possibilidade de ter altas produtividades (600-8000 kg/ha/safra) com pouca ou nula renovação de água (SANDIFER e HOPKINS, 1996). A partir disso vem crescendo as publicações no assunto, como exemplo, utilizando a palavra "biofloc" no Scopus de Elsevier em 2019 foram publicados 139 trabalhos e com a sigla "BFT" foram publicados 231 trabalhos.

1.1.2 Características

A tecnologia de cultivo em sistema de bioflocos consiste na manipulação da relação carbono e nitrogênio para o controle dos compostos nitrogenados, principalmente da amônia que em altas concentrações pode ser tóxica para os animais de cultivo (AVNIMELECH, 1999). O aproveitamento da cadeia microbiana permite formar agregados microbianos chamados também *marine snow*, *marine flake*, *microbial floc*, *bacterial floc*, *moulinettes*, sistema ZEAH (pelas siglas do inglês *zero exchange heterotrophic aerobic*), tecnologia de bioflocos, BFT (pelas siglas do inglês *Biofloc Technology*) ou bioflocos. Esses agregados são formados por algas, protozoários, bactérias, detritos orgânicos e inorgânicos, que além de controlar os compostos nitrogenados servem de suplemento alimentar para os animais de cultivo (AVNIMELECH et al., 2010).

Com relação aos compostos nitrogenados, dois grupos funcionais de bactérias são os principais responsáveis pela manutenção da qualidade da água em sistemas de cultivo com BFT: no primeiro grupo estão as bactérias heterotróficas, que assimilam a amônia; e o

segundo grupo são as bactérias quimioautotróficas, que realizam o processo de nitrificação (EBELING, TIMMONS, BISOGNI, 2006; HARGREAVES, 2006). As bactérias heterotróficas removem a amônia da coluna de água e a convertem em proteína celular, para isso precisam de uma relação carbo-hidrato:amônia alta (15-20:1), que pode ser mantida pela adição de uma fonte de carbono orgânico como melaço, açúcar, dextrose ou outras. As bactérias quimioautotróficas oxidam a amônia para nitrito e o nitrito para nitrato, que é muito menos tóxico para os organismos de cultivo. Esse processo reduz a alcalinidade do cultivo, por esse motivo é necessário adicionar uma fonte de carbono inorgânico como hidróxido de cálcio (cal) ou bicarbonato de sódio. As bactérias heterotróficas são muito mais rápidas em se estabelecer no sistema e controlar a amônia (tempo de duplicação aproximado de uma hora) em comparação às quimioautotróficas (tempo de duplicação de 24 horas). Adicionalmente, as algas usam o nitrogênio amoniacal total tóxico bem como os compostos fosfatados para construir estruturas celulares como proteínas e açúcares (RAY et al 2010). O zooplâncton consome algas e bactérias e pode desempenhar um papel importante na transferência de nutrientes dos produtores primários para os consumidores secundários (RAY et al., 2010).

O principal problema no cultivo heterotrófico é a alta produção de sólidos suspensos totais (SST), que devem ser removidos por meio de decantação para não afetar o crescimento dos camarões, o ideal é mantê-los abaixo de 600 mg L^{-1} ou 15 ml L^{-1} (SCHVEITZER et al., 2013b). Porém, os SST devem permanecer acima de 200 mg L^{-1} para que aconteça a nitrificação (SCHVEITZER et al., 2013b). Mesmo no sistema quimioautotrófico, a retirada de sólidos se faz necessária, neste caso os sólidos são mais finos, assim como a frequência de retirada é menor, esses sólidos têm maior teor de cinzas e por tanto menor porcentagem de sólidos suspensos voláteis (SSV) (EBELING et al., 2006).

Quando se inicia um cultivo em sistema de bioflocos se deve considerar que para estabilizar as bactérias quimioautotróficas é necessário passar por dois picos: o primeiro é o pico de amônia, que pode ser controlado com uma fonte de carbono orgânico; o segundo pico é o pico de nitrito que é o mais delicado, pois seu controle requer de mais tempo pois o nitrito pode chegar a valores tóxicos para o camarão, sendo necessário removê-lo por meio de renovação de água, principalmente em cultivos com baixas salinidades, pois o nitrito aumenta sua toxicidade (LIN, CHEN, 2001). Para evitar estes picos, estão sendo desenvolvidas novas estratégias como reuso entre 25 e 100% da água madura para próximos ciclos (KRUMMENAUER, et al., 2014) ou iniciar o ciclo com estimulo as bactérias nitrificantes, para isso se inicia com fertilização com sais de amônio e nitrito (FERREIRA, et al., 2020) o que pode se tornar uma estratégia prática.

1.1.3 Bioflocos como fonte de alimento para os organismos de cultivo

Os bioflocos além de controlar os compostos nitrogenados, podem se tornar um alimento suplementar para os animais de cultivo (EMERENCIANO, et al., 2012; MARTINS et al., 2020; LEGARDA et al., 2019). A composição dos bioflocos depende muito da fase bacteriana predominante, da fonte de carbono, da ração, iluminação, entre outros fatores de análise como análises em fresco ou seco (EMERENCIANO, GAIXOLA, CUZON, 2013; AVNIMELECH et al., 2010). A proteína dos flocos pode variar de 12 até 51%, os lipídeos de 0,5 até 15%, as cinzas de 18,3 até 51,8% (EMERENCIANO, GAIXOLA, CUZON, 2013; AVNIMELECH et al., 2010).

Os bioflocos também podem atuar como probióticos naturais (EMERENCIANO, GAIXOLA, CUZON, 2013) podendo inibir o crescimento de *Vibrio* sp. (MARTINS et al., 2020), assim como também podem evitar a proliferação de ectoparasitos (EMERENCIANO, GAIXOLA, CUZON, 2013).

1.1.4 Infraestrutura necessária

A estrutura mínima para cultivo de organismos em sistema de bioflocos deve contar com aeração constante com microbolhas para que tanto os organismos de cultivo como os flocos respirem. O sistema de aeração além de manter os níveis de oxigênio dissolvido ideal para os organismos de cultivo deve ser eficiente para manter toda a matéria orgânica em suspensão, evitando pontos anóxicos dentro dos tanques. Para manter a aeração é necessário ter um sistema de emergência preparado como um gerador de energia alternativo, ou como alternativa extrema na falta de oxigênio pode se adicionar peróxido de hidrogênio (água oxigenada) na relação de 7 ml para incrementar 1 mg em 1000 L, porém, deve se considerar que em altas concentrações pode ser tóxico para os animais de cultivo (FURTADO et al., 2014). Também é necessário ter tanques revestidos com geomembrana, para evitar a entrada de outros crustáceos que podem comprometer o cultivo por meio da entrada de patógenos. De maneira opcional se utilizam estufas agrícolas que ajudam a manter a temperatura constante evitar a presença de aves predadoras, assim como manter o controle iônico evitado a interferência da chuva. Os substratos artificiais, também são estruturas opcionais, e ajudam a aumentar a área de superfície, o que permite incrementar as densidades de cultivo até 500 camarões m^{-3} (SCHVEITZER et al., 2013a). Geralmente são cultivados camarões com boa procedência e linhagens de crescimento e/ou livres de patógenos específicos (SPF: *Specific*

pathogen free). Adicionalmente é necessário ter decantadores ou câmaras de sedimentação para retirar o excedente de sólidos suspensos totais.

1.1.5 Tecnologia sustentável

Os sistemas de cultivo com BFT têm sido amplamente utilizados na produção do camarão-branco-do-pacífico a elevadas densidades de estocagem com mínima ou nenhuma renovação de água, reduzindo consideravelmente o uso da área destinada ao cultivo de recursos hídricos em comparação com sistemas tradicionais semi-intensivos (SAMOCHA et al., 2012). Em sistemas intensivos se utiliza aproximadamente 10-50% do volume do viveiro para renovação de água por dia para manter os parâmetros de qualidade da água (SANDIFER, HOOPKINS, 1996) e no sistema de bioflocos apenas se fazem reposições do volume de água perdida pela evaporação, tornando-o um sistema amigável com o meio ambiente ao usar melhor este valioso recurso. Por outro lado, o sistema de BFT permite através da intensificação do cultivo utilizar menor área, aproveitando ao máximo o recurso natural solo. Ao reusar a mesma água para diferentes cultivos se reduz a descarga de efluentes (KRUMMENAUER et al., 2014). Os flocos por serem uma fonte alternativa de alimento para os organismos de cultivo podem diminuir as taxas de arraçoamento e aumentar a retenção de nitrogênio (BURFORD et al., 2004; WASIELESKY et al., 2006). Finalmente, o sistema de bioflocos é um sistema fechado e por consequência biosseguro evitando surtos de doenças ou fugas de animais (SAMOCHA et al., 2012).

1.1.6 Desafios do sistema

O sistema de cultivo em bioflocos ainda precisa ser aperfeiçoado, existem três desafios que precisam ser trabalhados. Primeiro, o desafio técnico, principalmente para manter os parâmetros de qualidade da água ótimos para os organismos cultivados; o segundo desafio é ambiental, já que é necessário tratar os efluentes gerados pelo cultivo para devolver a água para o corpo de captação nas mesmas ou melhores condições do que foi captada; o terceiro é o econômico, devido ao custo energético demandado devido principalmente à aeração constante assim como ao custo por tratar esses efluentes. Da mesma maneira esses três desafios estão diretamente relacionados.

Como citado nesta tese, os sólidos suspensos totais devem ser mantidos em níveis adequados para as espécies de cultivo para garantir o desempenho e saúde dos animais, e esse

excedente de sólidos é rico em nutrientes e, no caso do cultivo de camarão, é salino dificultando a utilização como fertilizante agrícola. Os nutrientes que são ofertados para os camarões não são 100% retidos pelos animais cultivados, apenas uma pequena porção do nitrogênio e outra pequena de fósforo são retidas pelos camarões e o restante fica dissolvido na água ou suspendido.

Os nutrientes como o nitrogênio (N) e o fósforo (P) dentro dos sistemas de cultivo de camarão provem da ração. Nos sistemas tradicionais o controle destes componentes em níveis adequados para os organismos de cultivo é feito mediante renovação de água ou na despesca. Nos sistemas fechados, como o sistema de bioflocos, onde não existe renovação de água a reciclagem de nutrientes é feita mediante os microorganismos, porém, o resíduo final dos processos biológicos se acumula durante o cultivo. Em sistemas tradicionais os camarões retêm 21% e em sistema de bioflocos de 18 a 30% do nitrogênio ofertado na ração, assim como de 10 a 20% do fósforo das dietas (AVNIMELECH et al., 2010). Assim, acredita-se que o sistema de bioflocos pode aumentar a retenção do nitrogênio no sistema (SILVA, WASIELESKY, ABREU, 2013).

Os conceitos de aquicultura multitrófica integrada (AMTI) podem ajudar a melhorar esse aspecto do sistema, sendo que alguns peixes têm potencial para aproveitar o excedente dos bioflocos e os organismos autótrofos podem absorver os nutrientes dissolvidos na água (PINHEIRO et al., 2017; POLI et al., 2019a; POLI et al., 2019b; MARTINS et al., 2020). Adicionalmente, é necessário aperfeiçoar o sistema de bioflocos, principalmente nos quesitos do uso dos sólidos suspensos totais ou lodos retirados, assim como no controle dos compostos inorgânicos que se acumulam durante o cultivo, principalmente o nitrogênio em forma de nitrato e o fósforo na forma de ortofosfato. Da mesma maneira a AMTI pode ajudar a melhorar a retenção de nutrientes provenientes da dieta (PINHEIRO et al., 2017; POLI et al., 2019a; POLI et al., 2019b; MARTINS et al., 2020), sabendo que as dietas são um dos insumos com maiores custos na aquicultura, por meio da diversificação de espécies com valor no mercado.

1.2 AQUICULTURA MULTITRÓFICA INTEGRADA

O conceito de Aquicultura Multitrófica Integrada (AMTI) vem das interações que ocorrem no ambiente natural, consiste em um sistema onde os rejeitos do cultivo de uma espécie são reciclados para converter-se em aportes (fertilizantes ou alimentos) para outras espécies (CHOPIN et al., 2001). A alimentação artificial é combinada com a aquicultura

vegetal (macroalgas, microalgas e plantas), ou combinada com outras espécies de peixes ou moluscos para criar sistemas balanceados para a sustentabilidade ambiental (biomitigação) assim como a estabilidade econômica pela diversificação de produtos e redução de riscos (CHOPIN et al., 2001).

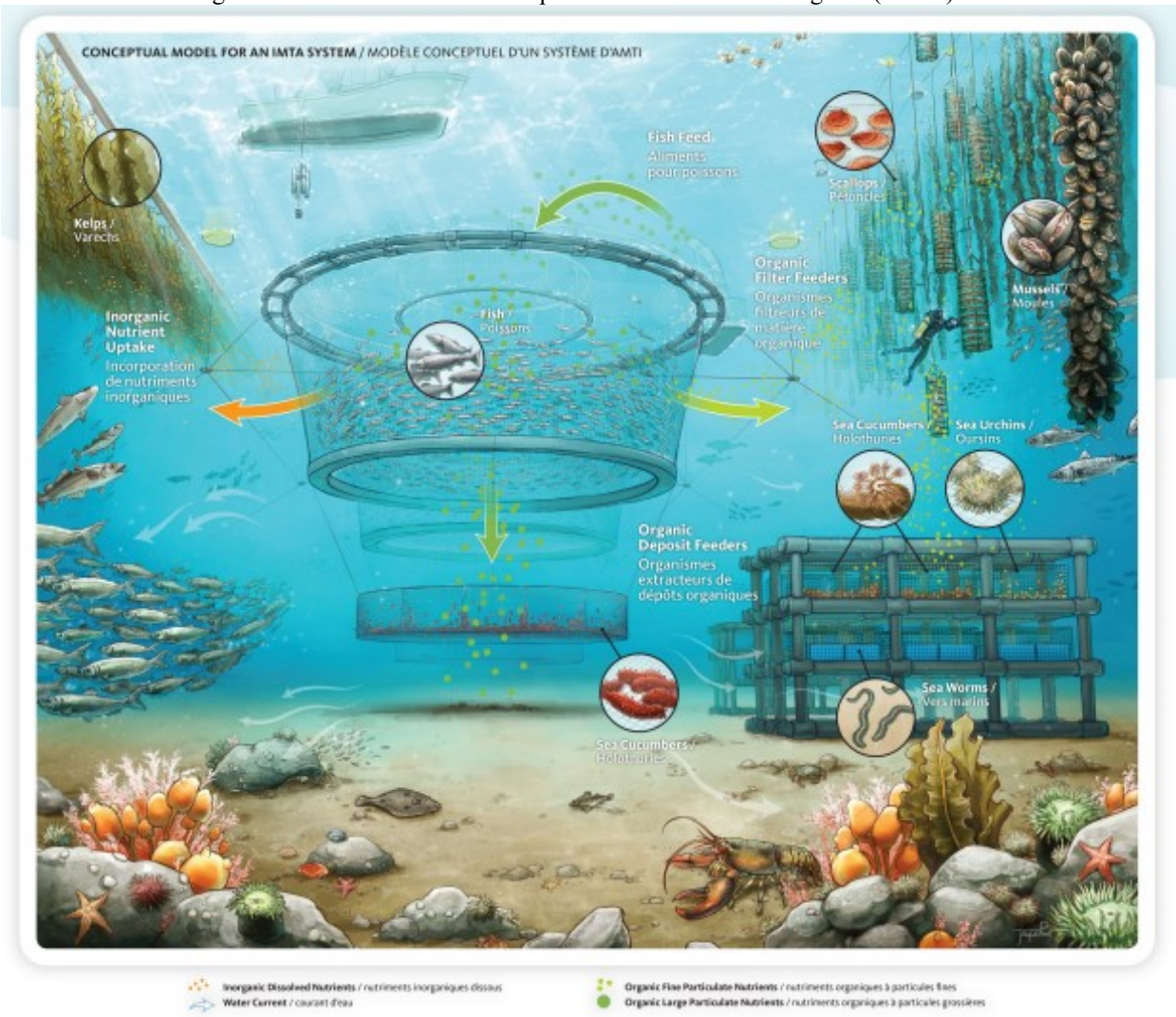
O termo "Multitrófica" refere-se à incorporação de espécies de diferentes níveis tróficos ou nutricionais no mesmo sistema (CHOPIN, 2006). Diferencia-se do policultivo que é o cultivo de espécies do mesmo nível trófico no mesmo ambiente, onde os organismos compartem os mesmos processos químicos e biológicos. A palavra "integrada" em AMTI significa o cultivo intensivo de diferentes espécies que estão conectadas pelos nutrientes e transferência energética através da água, mas não necessariamente no mesmo lugar (CHOPIN et al., 2001; CHOPIN, 2006; NEORI et al., 2004; TROEL et al., 2003).

O modelo conceitual base de AMTI é o cultivo de salmão em gaiolas flutuantes os quais são alimentados e seus rejeitos na forma de sólidos suspensos totais são aproveitados para o cultivo de mexilhões, pela corrente marinha, e os compostos inorgânicos são assimilados por macroalgas, neste caso são kelps; também existem organismos que consomem os detritos como o pepino do mar (Figura 1).

Também existem reportes de várias combinações de peixes, crustáceos, moluscos e macroalgas (TROEL et al., 2003) não somente no mar aberto, senão também *indoor* em tanques (ABREU et al., 2009 e 2011). A maioria dos sistemas têm demonstrado que este sistema pode ser uma alternativa para biorremediar os compostos inorgânicos nos sistemas de cultivo tradicionais (TROEL et al., 2003). Por exemplo, em sistemas de cultivo em água doce os efluentes de um monocultivo podem ser utilizados como fertilizantes para cultivos de hortaliças, (KÖNIG et al., 2018), mas em cultivos marinhos as altas salinidades limitam essa prática, e para isso tem sido estudados sistemas de aquaponia com plantas halófitas (PINHEIRO et al., 2017; POLI et al., 2019), ou em efluentes de cultivos com baixas salinidades podem ser aplicados como fertilizantes para tomates (MARISCAL-LAGARDA, PÁEZ-OSUNA, 2014).

Tem sido pouco estudada a AMTI em BFT, e ainda há muito para ser estudado antes de se estabelecer um sistema comercial. Porém, existem alguns estudos preliminares em co-cultivo de camarão e macroalgas como *Ulva lactuca* e *Gracilaria birdiae* (BRITO et al., 2014a, 2014b). Outro trabalho integrou camarão, tilápia e uma planta halófita, *Sarcocornia ambigua* (POLI et al., 2019).

Figura 1. Modelo conceitual de Aquicultura Multitrófica Integrada (AMTI).



Fonte: FOC, S.A.

1.3 TAINHA

As tainhas são peixes que pertencem à família Mugilidae que se encontram em todo o mundo em águas temperadas e tropicais costeiras, algumas espécies também se encontram em água doce (THOMSON 1984; NELSON 2006). Tem servido como uma importante fonte de proteína para consumo humano em toda sua área de distribuição (NASH, SHEHADEH 1980). No sul e sudeste brasileiro existe a tradição de consumo do peixe inteiro assim como de suas gônadas, no inverno (abril - junho) os peixes saem dos estuários para a reprodução, aproveitando as baixas temperaturas (LEMOS et al., 2014). Durante os últimos anos, a densidade encontrada no meio natural tem diminuído (MPA/MMA, 2015; SANT-ANA, KINAS., 2015), principalmente devido à mudanças climáticas e em menor medida a sobre-exploração (SANT-ANA, KINAS., 2015). Atualmente, está em desenvolvimento o pacote

tecnológico de produção de tainha começando pela reprodução em cativeiro de *Mugil liza* (CARVALHO et al., 2019). Ainda são necessários mais estudos de pesquisa e compilação de muita informação para fechar o ciclo produtivo em cativeiro, como a larvicultura, engorda, nutrição, sistema de cultivo mais apropriado, entre outros.

As tainhas pertencem ao grupo dos consumidores primários, se alimentam de microalgas diatomáceas, *Coscinodiscus* spp., além de alguns microcrustáceos (VASCONCELOS-FILHO et al., 2009). Oliveira e Soares (1996) reportaram o conteúdo estomacal em tainhas (*Mugil platanus*) em diferentes estações do ano em fase juvenil e adulta. Eles encontraram detritos vegetais e animais, como cianobactérias, algas, globigerina, rotíferos, larvas de poliquetas, gastrópodes, bivalves, microcrustáceos, larvas, trematodos e nematodos. Os mesmos autores encontraram que a variação durante o ano depende mais da disponibilidade do que da preferência, assim essa espécie é detritívora.

Os mugilideos são peixes eurihalinos e euritérmicos (VASCONCELOS-FILHO et al., 2009), tendo o potencial de cultivo em diversos ambientes, inclusive em sistema de bioflocos (MELO et al., 2016; VINATEA et al., 2018; HOANG, NGUYEN, BOSSIER, 2020), assim como também tem potencial para policultivo (MELO et al., 2016; HOANG et al., 2016). Recentemente, tem se demonstrado que podem consumir bioflocos e aproveita-los para crescer ajudando a diminuir o impacto causado pelos efluentes de um monocultivo de camarão e incrementando a retenção de fósforo do sistema (LEGARDA et al., 2019).

1.4 MACROALGAS

A produção de macroalgas tem incrementado 37% de 2010 a 2017 (FAO-FIGIS, 2019). Em 2017 se reportou uma produção mundial de 32 milhões de toneladas que representaram quase 12 milhões de dólares (FAO-FIGIS, 2019). O incremento da produção das macroalgas se deve principalmente ao aumento da demanda pelas suas características anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas, entre outras que estão diretamente relacionadas com os polissacarídeos que elas sintetizam (SAKTHIVEL, DEVI, 2019). Do mesmo modo estão sendo utilizadas diretamente para consumo humano ou como espessantes na indústria alimentícia (carragenana), os resíduos ou algas de baixa qualidade são utilizadas na agroindústria (FAO, 2016; 2018).

As macroalgas têm a capacidade de absorver os compostos diluídos na água e incorpora-los como biomassa (GRAHAM, 2009). Dentre os compostos essenciais para as macroalgas encontramos o nitrogênio, fósforo, cloro, enxofre, cálcio, magnésio e potássio.

- Nitrogênio é utilizado principalmente para formar os aminoácidos, nucleotídeos, clorofila e ficobilinas
- Fósforo que se utiliza na produção de ATP, ADN e fosfolipídeos
- Cloro utilizado para a produção de oxigênio no processo da fotossíntese
- Enxofre para formar alguns aminoácidos, para a nitrogenase, lipídeos dos tilacóides, carragenana, agar, biotina (dependendo da macroalga)
- Cálcio para formar o alginato e carbonato de cálcio
- Magnésio para clorofila
- Potássio para agar, carragenana e para a osmoregulação

A limitação de algum desses nutrientes pode afetar o crescimento das macroalgas (GRAHAM, 2009). Além disso, pesquisadores dos Estados Unidos estão promovendo o cultivo de macroalgas pela capacidade destas em atenuar mudanças climáticas, principalmente pela capacidade das mesmas em captar carbono (FROEHLICH et al, 2019). Recentemente foi descrito que as macroalgas e seus metabolitos derivados atuam como prebióticos ou alimentos funcionais, melhorando a saúde intestinal em humanos (CHAROENSIDDHI, 2019).

Dentre as macroalgas, destacamos a *Ulva* sp., uma alga verde que suporta variações de salinidade e seu crescimento é oportunista (MSUYA; NEORI, 2008). A *U. lactuca* tem uma alta taxa fotossintética e capacidade de absorção de nitrogênio dissolvido (NALDI; WHEELER, 2002), é uma espécie cosmopolita e que tem a capacidade de biorremediar ambientes com altas concentrações de nutrientes (TROEL et al., 2003). Pode ser co-alimento para o camarão, podendo substituir em até 50% a ração comercial (PALLAORO; VIEIRA; HAYASHI, 2016).

No Brasil ainda não existe um mercado formado para a *Ulva* sp. Um dos potenciais usos é a utilização da biomassa de algas produzidas como aditivos alimentares, devido aos compostos bioativos que possuem as macroalgas (PESO-ECHARRI, 2012; SCHLEDER et al., 2018).

1.4.1 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva* sp.

A *Ulva* sp., possui um polissacarídeo (ulvana) (PESO-ECHARRI et al., 2012), a ulvana é um ingrediente funcional e tem mostrado potencial na melhora do sistema imunológico de organismos aquáticos (PESO-EHARRI et al., 2018). Nos últimos anos tem sido o foco de pesquisas para utilização como alternativa ao uso de antibióticos (PESO-

ECHARRI et al., 2012). Também Vizcaíno et al., (2019), observaram que adicionar 5% da macroalga *Ulva ohnoi* na dieta pode ajudar a melhorar o epitélio intestinal em linguado branco (*Solea senegalensis*) quando administrado por um período de 45 dias, além da *Ulva* estar relacionada com a modulação de genes que envolvem o metabolismo de proteína e lipídeos.

1.5 Seriola dorsalis

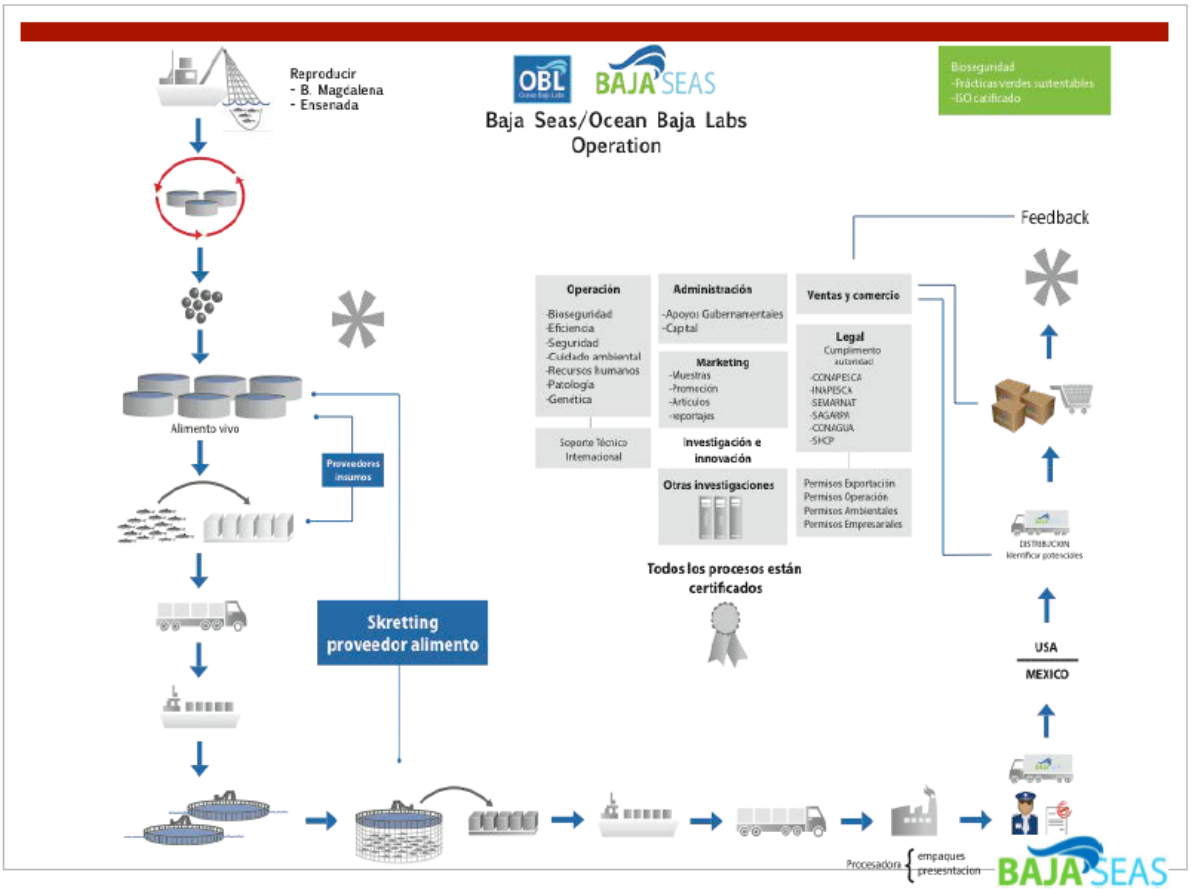
A *Seriola dorsalis* conhecida como *california yellowtail*, hiramasa, kingfish o amberjack, jurel, medregal, olhete, entre outros, é um peixe muito apreciado no mercado pela qualidade do filé (Figura 2), este peixe pode ser consumido fresco, congelado, salgado ou seco (Instituto Nacional de Pesca do Governo do México, 2012).

Segundo a FAO-FIGIS (2019), o cultivo deste peixe está em crescimento acelerado a partir de 2014, crescendo de uma tonelada em 2014, para 50 toneladas em 2017 e neste último ano movimentou 507 mil dólares. Existe o pacote tecnológico para sua produção em cativeiro, a larvicultura e alevinagem se fazem em sistemas de recirculação e depois a engorda em gaiolas flutuantes no mar aberto (Figura 2).

O cultivo comercial no Japão, antigamente, começava com a captura de juvenis do meio natural, que se encontravam associados às macroalgas (ANRAKU, AZETA, 1965; KOLKOVSKI, SAKAKURA, 2004). Atualmente, o cultivo da *Seriola* já está estabelecido, se maturam os indivíduos com dietas frescas ricas em proteína, ácidos graxos e vitaminas, assim como imuno-estimulantes; se realiza a reprodução em cativeiro por dois métodos com desova espontânea nos tanques (com controle de temperatura e fotoperíodo) ou também com uma única dose hormonal; tem se observado que a presença de carotenoides como astaxantina nas dietas dos reprodutores podem duplicar a produção de ovos e também melhorar a qualidade dos mesmos (KOLKOVSKI, SAKAKURA, 2004). Na fase larvária estes peixes crescem muito rápido quando comparados com outros peixes marinhos, consomem dietas ricas em ácidos graxos que são subministradas por meio de rotíferos e artêmia (KOLKOVSKI, SAKAKURA, 2004). Porém ainda existem dois picos de mortalidade, o primeiro na primeira alimentação e o segundo causado pelo canibalismo nas fases iniciais (SAKAKURA, TSUCAMOTO, 1999). O canibalismo nesta espécie é observado em baixas densidades de estocagem e em indivíduos do mesmo tamanho (KOLKOVSKI, SAKAKURA, 2004). Já existem dietas comerciais para esta espécie, porém, ainda existem alguns desafios a serem

resolvidos; um deles é a susceptibilidade a parasitas, assim como deformidades causadas pela nutrição inadequada.

Figura 2. Esquema do ciclo de produção do peixe olhete (*Seriola dorsalis*).



Fonte: Ficha técnica BajaSeas

1.6 ECONOMIA CIRCULAR NA AQUICULTURA

A economia circular é um sistema que busca aproveitar os recursos para reduzir, reciclar e reutilizar o que se descarta e dá-lhe uma segunda vida e devolvendo-os ao mercado com uma nova forma. Muitas empresas estão desenvolvendo seus negócios em torno deste modelo produtivo sustentável (HAAS et al., 2015). Esse inovador modelo advoga pelos materiais biodegradáveis os quais na fabricação dos produtos seja a menos invasiva possível, evitando a contaminação. O objetivo final é que quando houver descarte na impossibilidade de se reutilizar os materiais, os mesmos possam ser reciclados de uma maneira amigável com o meio ambiente.

O termo “economia circular” foi utilizado pela primeira vez para descrever um sistema fechado nas interações economia e meio ambiente. Essa economia faz parte do estudo

de retroalimentação de sistemas não lineares, sistemas dinâmicos (OECD, 2009), abrange outros conceitos como a economia azul, ecologia industrial e biomimetica (ELLEN MACARTHUR FOUNDATION, 2013). Japão e Alemanha se baseiam na gestão dos resíduos pelo 3R (reduzir, reciclar e reutilizar), a ideia é transformar o fluxo econômico linear onde o recurso se converte num produto e gera resíduos num modelo com fluxo circular, onde o recurso se converte num produto e o resíduo gerado é transformado ou reciclado (ELLEN MACARTHUR FOUNDATION, 2013).

Na aquicultura, segundo a FAO (2018), pode se aplicar o conceito de economia circular na pesca e na aquicultura para evitar a geração de desperdícios e eliminar o uso de plásticos de único uso. Assim, também se pode aplicar este conceito para gerar sistemas eficientes e resilientes.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Gerar conhecimento sobre a aquicultura multitrófica integrada de camarão, peixe marinho e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos aplicando conceitos da economia circular para incrementar a sustentabilidade.

1.7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito da integração do camarão-branco-do-pacífico e a tainha (*Mugil curema*) em sistema de bioflocos sobre a qualidade da água, o crescimento dos animais, a retenção e balanço de massas de fósforo e nitrogênio, assim como os parâmetros hematológicos e imunológicos dos peixes.
- ✓ Comparar diferentes densidades de tainha (0, 22, 43 e 65 peixes por tanque de 100 L) integradas ao cultivo de camarão-branco-do-pacífico em sistema de bioflocos sobre o desempenho, qualidade da água, retenção de nitrogênio e fósforo, balanço de massas de nitrogênio e fósforo, assim como sobre o uso de água.
- ✓ Avaliar o efeito da integração de *Ulva fasciata* ao sistema de cultivo integrado de camarão e tainha (*Mugil liza*) em sistema de bioflocos sobre a qualidade da água, desempenho animal e algal, retenção de nitrogênio e fósforo, compostos bioativos da macroalga e rendimento de ulvana.

- ✓ Avaliar o efeito da adição de diferentes níveis da *Ulva* produzida no sistema integrado em bioflocos na dieta para *Seriola dorsalis* sobre o crescimento, saúde dos peixes e qualidade do filé.

1.8 ESTRUTURA DO TRABALHO

A presente tese está dividida em quatro capítulos referentes aos artigos científicos. O primeiro capítulo está publicado na revista *Aquaculture.* O segundo capítulo foi submetido na revista Aquaculture Research. O terceiro está formatado nas normas da revista *Journal of Applied Phycology* e o quarto capítulo está formatado nas normas da revista Aquaculture como comunicação curta.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1 CAPÍTULO I: SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO AQUÍCOLA INTEGRADO DE TAINHA E CAMARÃO USANDO A TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS

Artigo publicado na revista Aquaculture, Volume 512, 15 outubro 2019, 734308. DOI: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734308

Highlights

- ✓ Integration of mullet and shrimp increased biofloc system yield by 11.9%.
- ✓ Integration of shrimp and mullet in a biofloc was ecologically more efficient and increased phosphorus retention by 16.8%
- ✓ Feed restriction in the biofloc system did not compromise fish health.

Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology

Esmeralda Chamorro Legarda[a], Moisés Angel Poli[a], Mateus Aranha Martins[a], Scheila Anelise Pereira[b], Mauricio Laterça Martins[b], Claudia Machado[a], Marco Antonio de Lorenzo[a], Felipe do Nascimento Vieira[a*]

[a] Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua dos Coroas 503, CEP 88061-600, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[b] AQUOS – Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

[*] Corresponding author. E-mail address: felipe.vieira@ufsc.br

Abstract

We evaluated an integrated system for rearing Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and white mullet (*Mugil curema*) in an experimental-scale biofloc system. Performance of the animals, water quality, phosphorus and nitrogen retention and mass balance, and fish hematology and immunology were compared among two treatments: 1) shrimp with mullet integrated system (Shrimp+Mullet), and ii) shrimp without mullet system (Shrimp). A tank with 800 L of useful volume was used to rear the shrimp with a density of 250 shrimp m^{-3}. Another tank with 90 L of useful volume was maintained for rearing fish (15 mullet $tank^{-1}$) in the Shrimp+Mullet treatment. The shrimp treatment also used the 90-L tanks, but without the fish. Water was recirculated into the mullet tanks via a submerged pump and returned by gravity to the shrimp tanks. The shrimp were fed four times a day. A feeding table was used to adjust the amount of feed provided, and the fish were fed only once daily with a ratio of 1% initial biomass to stimulate biofloc consumption (BFT). After 53 days, shrimp growth (final weight 12.56 ± 0.22 g) and survival (91.8% ± 2.9%) were similar between treatments. Fish had adequate survival (91.1% ± 10.2%), and adequate growth for *Mugil* species (0.71 ± 0.05 g $week^{-1}$) in the integrated system. In the Shrimp+Mullet treatment, animal productivity was increased by 11.9% by combining Shrimp+Mullet biomass, when compared to the Shrimp treatment. The Shrimp+Mullet treatment also demonstrated a 16.8% increase in phosphorus retention compared to the Shrimp treatment. The hemato-immunological parameters showed that fish kept in a biofloc system had adequate values comparable to those reported for *Mugil* species. Thus, these experimental-scale results demonstrate that the integration of shrimp and mullet in biofloc systems increases yield and phosphorous retention without compromising fish health and shrimp growth. In addition, we recommend reproducing this integrated system over a longer period and at commercial-scale, supporting an economic analysis.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Mugil curema*, Integrated Multi-Trophic Aquaculture, Biofloc, RAS, hemato-immunological parameters.

Abbreviations

BFT: biofloc technology
IMTA: Integrated multi-trophic aquaculture
MCH: mean corpuscular hemoglobin
MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV: mean corpuscular volume
N: nitrogen
P: phosphorous
RAS: Recirculating aquaculture system
RBC: red blood cells
FSS: fixed suspended solids
TSS: total suspended solids
VSS: volatile suspended solids
WBC: white blood cells

2.1.1 Introduction

With the increase in world aquaculture production, new environmentally friendly farming technologies have emerged, increasing sustainability and biosecurity (FAO, 2018a). Among them, the biofloc system is an alternative to traditional systems in that it seeks to significantly reduce the amount of water used during the rearing of a species (Otoshi et al., 2007) and to increase yield (Samocha et al., 2012). However, the biofloc system has some drawbacks, such as the accumulation of solids in the system, as a result of the portion of feeds that the cultured species cannot eat or assimilate (Schveitzer et al., 2013). High concentrations of total suspended solids (TSS) are known to negatively affect the animals (Schveitzer et al., 2013); therefore, it is necessary to remove TSS, usually with settling chambers (Ray et al., 2010). In addition, at the end of rearing, the system produces effluents rich in nitrogen and phosphorous, such as nitrates and orthophosphates (Avnimelech, 2012). In freshwater system, these solids and effluents can be reused as fertilizers for plant crops (König et al., 2018), while in saline environments, effluents can be used in aquaponic systems with halophyte plants (Pinheiro et al., 2017). In cultures with low salinity, the effluents can be reused as a source of nutrients for growing such plants as tomatoes (Mariscal-Lagarda et al., 2014). In this sense, the potential for the reuse of these nutrients as fertilizer or food for species of other trophic levels, known as integrated multi-trophic aquaculture (IMTA), is sparking increased

interest because of its attendant environmental, economic and social implications (Chopin et al., 2006).

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) are known to recover only 18 to 30% of the nitrogen (N) and 10 to 20% of the phosphorus (P) supplied. The remainder is accumulated in culture water during rearing. N is recovered in its reduced forms as nitrites and nitrates, or even in microbial bioflocs (Avnimelech, 2012). Both, nitrogen and phosphorous can be a source of food (Crab et al., 2007) for species at lower trophic levels, such as omnivores, herbivores or detritivores (Chopin et al., 2006).

Mullets (*Mugil* sp.) are detritivorous (Oliveira and Soares, 1996; Vasconcelos-Filho et al., 2009), euryhaline and eurythermic (Vasconcelos-Filho et al., 2009), making them suitable species for rearing in biofloc systems (Melo et al., 2016; Vinatea et al., 2018). Polyculture of *Mugil curema* and *Litopenaeus schmitti* in a biofloc system has been reported (Melo et al., 2016). In addition, mullets are fish species of commercial interest, although some natural stocks have been diminished as a result of overexploitation (MPA/MMA, 2015).

To assess whether rearing systems can be productive without harming the fish, we must evaluate the physiological responses of animals kept in such systems. Hematological parameters can be used to assess the physiological, pathological and nutritional state of fish (Ranzani-Paiva et al., 2013). Immunological markers can identify the presence of pathogens (Kakoolaki et al., 2016) and, hemato-immunological tests allow us to assess the presence of anemia (Fazio, 2019) or threats by parasites, bacteria or viruses (Lieschke and Trede, 2009). Few hematological or immunological data can be found for mullet, and the behavior of these variables for mullets in IMTA systems in biofloc is unknown.

Thus, this study evaluated the effects of integrating Pacific white shrimp and white mullet in a biofloc system on water quality, growth performance of animals, nitrogen and phosphorus retention and mass balance in the system, and hematological and immunological parameters of the fish.

2.1.2 Materials and methods

2.1.2.1 Location

The experiment was conducted at the Marine Shrimp Laboratory (LCM), which is part of the Aquaculture Department of the Federal University of Santa Catarina in Florianópolis, Brazil, and lasted 53 days, from December 19, 2017 to February 9, 2018.

2.1.2.2 Biological material

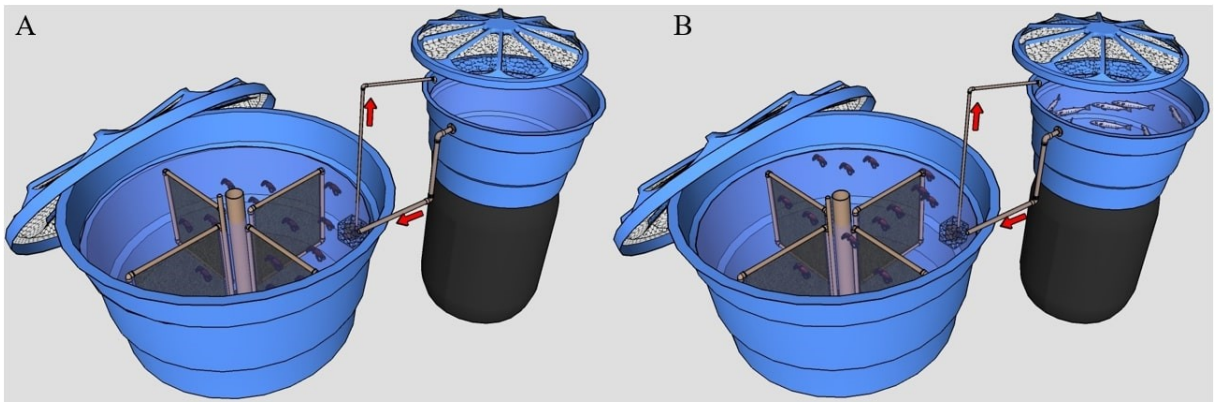
SPEEDLINE HB16 shrimp nauplii were purchased from AQUATEC (State of Rio Grande do Norte, Brazil), and after development, post-larvae were transferred to a 50,000-L matrix tank where they were kept in bioflocs until reaching the initial weight of the experiment (3.5 g).

During the month of November 2017, mullet specimens were collected at the Lagoa da Conceição, Florianópolis, Brazil (IBAMA/ICMBio permit 34842143), acclimated in tanks with constant water renewal and adapted to artificial feed (Guabitec J40, GUABI®, Sales Oliveira, São Paulo, Brazil). After acclimation, 60 mullets were held in four 90-L tanks. This work was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFSC (Protocol n° 798130617).

2.1.2.3 Experimental units, experimental design and system management

Experimental units consisted of a 1000-L (800 L of useful volume) tank to rear shrimp and another 100-L tank (90 L of useful volume) to rear mullets, both tanks round in shape and located inside a greenhouse. Water circulated through a submerged pump (Sarlo-Better, 650 L $hour^{-1}$) to the mullet tank and returned by gravity to the shrimp tank (Fig 3). The shrimp rearing unit had an 800-W heater, a thermostat to maintain the temperature at 28 ± 1 °C, and a microperforated hose and a blower aeration system to keep the bioflocs in suspension and maintain oxygen above 5 mg L^{-1}. Shrimp tanks also were equipped with four artificial substrates (high-density 100% polyester, Needlona® (Renner Textil Ltda; Cachoeirinha, Brazil), having a rectangular design (0.40×0.55 m) and vertically oriented (Fig 3), which corresponded to 80% of the surface area of the tank, as recommended for increasing shrimp density in a biofloc system (Schveitzer et al., 2013). The mullet tank had a 100-W heater, a thermostat to maintain the temperature at 28 ± 1 °C, and four air stones attached to the same blower that aerated the shrimp tank. No water exchange occurred during the experiment. Fresh water was added only to replace water lost by evaporation. Alkalinity control was performed by the addition of calcium hydroxide to maintain the alkalinity above 120 mg L^{-1}.

Fig 3. Flow diagram for experimental units of: (A) a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp), and (B) a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet). Illustration, Vitor Fernandes Silva.



Shrimp were reared at a density of 250 shrimp m^{-3} (200 shrimp $tank^{-1}$) in all experimental units. For the treatment with mullets, the chosen density was 167 mullet m^{-3} (15 mullet $tank^{-1}$). The Shrimp treatment was not stocked with fish; however, water circulation was maintained for both tanks, as shown in Fig 3.

The experimental design consisted of two treatments: i) shrimp rearing integrated with mullet in a biofloc system (Shrimp+Mullet), and ii) shrimp rearing without mullet in a biofloc system (Shrimp). The experiment was performed with a completely randomized design with four replicates for each treatment.

At the beginning of the experiment, shrimp and fish had average weights of 3.50 ± 0.04 g and 15.92 ± 2.33 g, respectively. Shrimp were fed with a 35% crude protein commercial feed (Guabitec 1.6 mm Guabi®, Sales Oliveira, São Paulo, Brazil) four times a day according to the Van-Wyk (1999) feeding table, and feed consumption was controlled throughout the experiment with the aid of a feed tray (Poli et al., 2019). Mullets were fed with a 40% crude protein feed (Guabitec J40 Guabi®, Sales Oliveira, São Paulo, Brazil) only once daily at 1% of initial biomass, stimulating the mullet to take advantage of the biofloc as food.

Each shrimp tank was inoculated with 800 L of water from the shrimp matrix tank with salinity 33 g L^{-1}, ammonia (TAN) 0.28 mg L^{-1}, nitrite ($N\text{-}NO_2$) 0.00 mg L^{-1}, nitrate ($N\text{-}NO_3$) 5.06 mg L^{-1}, alkalinity ($CaCO_3$) 131 mg L^{-1}, pH 8.03 and total suspended solids (TSS) 453 mg L^{-1}. For the Shrimp+Mullet treatment, each 90-L tank started with seawater, and after the shrimp and fish were stocked, submerged pumps in the shrimp tanks were activated to circulate the water within the system.

2.1.2.4 Water quality

The temperature and dissolved oxygen were measured twice a day with YSI Pro 20 meter. The alkalinity (Titration, APHA et al., 2005-2320 B), pH (Tecnal pH-meter) and salinity (EcoSense® EC300A) were measured twice a week. Ammonia (TAN) was measured by the indophenol with trione method, according to Grasshoff et al. (1983). Nitrite ($N\text{-}NO_2$) was measured by the Griess reaction method (Strickland and Parsons, 1972). TSS, volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) were analyzed twice a week by the gravimetric method (APHA et al., 2005-2540 E). Nitrate (Hach's NitraVer 5 nitrate reagent powder pillows) and orthophosphate (4500-P C Colorimetric method, APHA et al., 2005) were analyzed weekly, and chlorophyll *a* were analyzed every two weeks (APHA et al., 2005).

2.1.2.5 Sludge produced

TSS were maintained between 400 and 600 mg L^{-1}, levels considered suitable for *L. vannamei* (Schveitzer et al., 2013), and excess solids were removed using conical settling tanks. The removed solids were quantified considering the volume of sludge and the concentration of TSS in the sludge. To quantify the volume of sludge removed, graded buckets were used, and the concentration of TSS in the sludge was measured according to APHA et al. (2005).

At the end of production, the total amounts of sludge produced in each experimental unit were calculated by the following equation: *Sludge produced* (g $tank^{-1}$) = $[((TSS\ final \times V_1)-(TSS\ initial \times V_1)/1000) + (\sum(TSS_{Sludge} \times V_2))]$, where V_1 corresponds to the volume of the tank in liters, *TSS final* is the concentration of TSS at the end of the experiment, *TSS initial* is the concentration of suspended solids at the beginning of the experiment, TSS_{Sludge} is the concentration of total suspended solids in the sludge removed, and V_2 is the volume of sludge removed (measured with volumetric buckets).

The *Sludge:biomass* ratio represents the sludge produced per total final biomass, and it was calculated as *Sludge biomass ratio* = *Sludge produced* (kg)/ *Total biomass* (kg).

2.1.2.6 Shrimp and mullet performance

Shrimp performance was evaluated by weekly weighing a sampling of 20 shrimps. At the end of the rearing period, survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR), yield (kg m^{-3}), and weekly growth (g $week^{-1}$) were measured.

Sampling weight of the fish was measured at the beginning and end of the experiment. Mullet performance was evaluated by measuring survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR), and yield (kg m^{-3}).

Final biomass and productivity of shrimp plus fish (combined) also were evaluated. The *total biomass produced* (Shrimp+Mullet) was divided by the total volume of the system (800 L of the shrimp tank + 90 L of the fish tank).

Following the formulas that were used: Survival = (final number of shrimps / initial number of shrimps) * 100; FCR = feed offered (g) / biomass gain (g); yield = harvested biomass (kg) / tank volume (m^3); weekly growth = {(final average weight (g) - initial average weight (g)) / (days of experiment / 7)}.

2.1.2.7 Nitrogen and phosphorus recovery

At both the beginning and end of the experiment, a 100 g sample of shrimp and a 100-g sample of mullet were collected. To determine the concentration of N, the Kjeldal (NTK) method was used, while for P content, the colorimetric method was employed, using the methodology described by AOAC (2005) for whole animals.

The recovery of nitrogen and phosphorus was calculated according to the respective equations provided by NRC (2011): *Recovery* (%) = [(*final weight* X *final nutrient* (N or P)) – (*starting weight* X *initial nutrient* (N or P) x 100]/*nutrient input - feed* (N or P).

2.1.2.8 Nitrogen and phosphorus mass balance

Initial biomass of shrimp and mullet, feed intake for shrimp and fish, as well as their respective nitrogen and phosphorus contents, were considered as nutrient inputs. The outputs were final nitrogen and phosphorus from shrimp and mullet biomass and effluent. Nitrogen and phosphorus from effluent were calculated by difference considering the total nitrogen or phosphorus of the input as 100% (Cerozi and Fitzsimmons, 2017) minus the nitrogen and phosphorus from final shrimp and mullet biomass. For each item, the biomass was multiplied by the nitrogen and phosphorus contents at the beginning and end of the experiment (Cerozi and Fitzsimmons, 2017).

2.1.2.9 Hematological and immunological parameters

After 53 days of experimental cultivation, nine fish of the Shrimp+Mullet treatment, anaesthetized with Eugenol (75 mg L^{-1}), were collected for hemato-immunological analyses.

For hematological parameters, blood was collected by puncture of the caudal vessel with a 3-mL syringe containing EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid). A 5-mL sample of blood was added in 1-mL of Dacie solution (sodium citrate, 37-40% formalin and toluidine blue) according to Blaxhall and Daisley (1973) to quantify the total number of erythrocytes in a Neubauer chamber. A total of 3 mL of blood was used to make duplicate slides of blood stained with May-Grunwald-Giemsa-Wright for differential leukocyte count and total counts of thrombocytes and leukocytes by the indirect method (Ranzani-Paiva et al., 2013). An aliquot of the blood was used to determine hematocrit. Finally, 16 µL of blood were used to quantify hemoglobin and to perform hematimetric calculations of mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) from the following equations (Ranzani-Paiva et al., 2013): *MCV* = (*Hematocrit* x 10) / (*Erythrocyte number*); *MCH* = (*Hemoglobin* x 10) / (*Erythrocyte number*); and *MCHC* = (*Hemoglobin* x 100) / (*Hematocrit*).

After an overnight incubation at 4°C, a pooled sample was obtained from three animal samples. Plasma was obtained from centrifugation at 1400 *g* for 15 minutes at 4°C and stored at -20°C for further immunological analyses.

Blood plasma protein was measured using a Total Protein kit (Biotécnica, Varginha, MG, Brazil), using bovine serum albumin to make the standard protein curve. Total immunoglobulin concentration was measured according to the method described by Amar et al. (2000) whereby 100 µL of plasma was diluted in 100 µL of 12% polyethylene glycol solution (PEG, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h. The immunoglobulin precipitate was removed by centrifugation (5000 g at 6 °C for 10 min), followed by removal of the supernatant to measure the amount of total protein. The total immunoglobulin concentration was expressed in mg mL^{-1}, calculated as *Total immunoglobulin* = (*total plasma protein - total protein treated with PEG*).

The binding activity of plasma was quantified in 96-well U-bottomed plates, where plasma was diluted at the ratio 1:3 in phosphate-buffered saline solution (PBS) in the first well (50 µL plasma: 150 µL PBS solution), followed by serial dilutions using a factor of 1:2 in the other wells until the twelfth well. After that, 50 µL of inactivated *Streptococcus agalactiae* bacteria (strain GRS 2035 isolated from Nile Tilapia) was added at a concentration of $1x10^8$ CFU mL^{-1} to all wells. The microplate was incubated at 25°C for 18 hours in a humid chamber. Agglutination was confirmed by the observation of the bottom of the well. The binding titer was considered to be the reciprocal of the last dilution that showed agglutination (Silva et al., 2012).

2.1.2.10 Statistical analysis

All data were analyzed by the *t*-test with $p<0.05$ indicating significance, assessing the normality assumption by the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by the Bartlett test (Zar, 2010).

2.1.3 Results and Discussion

2.1.3.1 Water quality

Growth and animal health are directly related to water quality conditions in aquaculture (Boyd, 2017). In a biofloc system, the most important parameters are dissolved oxygen, ammonia, nitrite, alkalinity, pH and total suspended solids (TSS), essentially because this cultivation system uses a reduced amount of water (Otoshi et al., 2007), and these parameters are controlled with different strategies (Avnimelech, 2012). In the present study, all water quality parameters remained optimal for shrimp (Van-Wyk and Scarpa, 1999) and for mullet (Sampaio et al., 2002; Boyd, 1982) culture.

Table 1. Physical and chemical variables for water in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

	Shrimp+Mullet	**Shrimp**	***p***
Dissolved oxygen (Shrimp) (mg L^{-1})	5.69 ± 0.10	5.73 ± 0.07	0.60
Temperature (Shrimp) (°C)	29.12 ± 0.31	28.82 ± 0.32	0.41
Dissolved oxygen (Fish) (mg L^{-1})	5.54 ± 0.09*	5.74 ± 0.08*	0.03
Temperature (Fish) (°C)	29.12 ± 0.29	28.85 ± 0.35	0.54
Salinity (g L^{-1})	35.06 ± 0.87	34.68 ± 0.43	0.47
pH	8.00 ± 0.06	8.07 ± 0.02	0.07
Alkalinity (mg L^{-1})	139.23 ± 6.55	147.53 ± 8.25	0.17
TAN – N [a] (mg L^{-1})	0.17 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.22
Nitrite N – NO_2 (mg L^{-1})	0.19 ± 0.01*	0.13 ± 0.01*	<0.05
Nitrate N – NO_3^{2-} (mg L^{-1})	9.13 ± 1.39	8.66 ± 0.39	0.54
Orthophosphate PO_4^{3-} (mg L^{-1})	2.54 ± 0.34*	1.70 ± 0.10*	<0.05
Chl-a [b] (µg L^{-1})	66.05 ± 6.15	60.23 ± 23.93	0.12

Data presented as mean ± standard deviation. * Indicate statistical differences by the *T* test (p <0.05). [a] Total ammonia nitrogen. [b] chlorophyll a.

The dissolved oxygen (in the fish tank), nitrite and orthophosphate were statistically different between treatments (Table 1), but these differences were not large enough to affect the growth performance of the animals. The difference between nitrite and orthophosphate among treatments probably was because the Shrimp+Mullet treatment had greater input of nutrients by the input shrimp feed and in addition fish feed.

2.1.3.2 Total suspended solids, sludge produced and sludge:biomass ratio

Biofloc rearing uses less water than traditional systems (Otoshi et al., 2007). However, at the end of the rearing, sludge production is high and needs to be dealt with, for example, harnessed for use in production of halophyte plants (Pinheiro et al., 2017).

In the present study, although the average sludge production in the Shrimp+Mullet treatment was higher than in the Shrimp Treatment, the sludge:biomass ratio did not differ statistically (Table 2); hence production of sludge depends on the amount of biomass produced.

Table 2. Total sludge produced, sludge:biomass ratio, total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

Parameter	Shrimp+Mullet	Shrimp	*p*
Total sludge production (kg tank^{-1})	0.72 ± 0.10*	0.54 ± 0.04*	0.02
Sludge:biomass ratio	0.28 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.13
TSS (mg L^{-1})	499.81 ± 11.65	477.17 ± 20.99	0.11
VSS (%)	40.59 ± 2.18	40.81 ± 1.21	0.87
FSS (%)	59.41 ± 2.18	59.19 ± 1.21	0.87

Data presented as mean ± standard deviation. * Indicate statistical differences by the *T* test ($p < 0.05$).

An excessive concentration of total suspended solids (TSS) can be lethal to shrimp by clogging the gills, thereby causing the animals to suffocate (Schveitzer et al., 2013). In this study, the TSS concentration remained suitable for shrimp (Schveitzer et al., 2013). For mullets, the maximum limit of TSS remains unknown; however, the fish exhibited good growth performance (Table 4).

The VSS in the present experiment was lower than FSS. This relationship and the presence of nitrate indicate that the microbes composing biofloc were predominantly chemoautotrophic (Ebeling et al., 2006), maintaining the characteristic of the initial inoculum.

2.1.3.3 Hematological and immunological parameters

Studies describing hematological parameters for fish of genus *Mugil* are limited. However, the hematological parameters found in the present study were within the range of variation found among the compiled works (Table 3, Ranzani-Paiva, 1997; Fazio et al., 2013; Akbary and Jahanbakhshi, 2016; Akbary et al., 2018). The results of the present work contribute some of the first data regarding the hematology and immunology of mullets in a biofloc system. The *Total protein concentration of plasma* was 34.16 ± 7.30 mg mL^{-1}. *Total*

immunoglobulin concentration of plasma was 20.13 ± 4.08 mg mL^{-1}. *Agglutination titer of plasma* was 2.25 ± 0.58 Log_2. The ratio of protein:agglutination was 15:1.

Studies on mullet immunology are few, but *total protein* values of 30 - 50 mg mL^{-1} (Kakoolaki et al., 2016) and 31 - 42 g dL^{-1} (Akbary and Jahanbakhshi, 2016) have been found. *Globulin* values of 15 - 35 g dL^{-1} were reported by Kakoolaki et al. (2016). The values of protein and immunoglobulin found in the present study were within the ranges of those reported.

Table 3. Hematological parameters of mullet (*Mugil curema*) cultivated in an integrated system with shrimp in bioflocs (Shrimp+Mullet) for 53 days with reference values reported by authors. RBC: red blood cells, WBC: white blood cells, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

		Reference values for Mugil sp			
Parameters	*Results*	A	B	C	D
RBC (10^6 μL^{-1})	2.56 ± 0.44	3.0-3.10	Lake: 2.21-4.47 Sea: 2.93-4.37	3.30-3.40	5.2-6.2
Hematocrit (%)	24.0 ± 2.50	32.2-35.30	Lake: 21.0-50 Sea: 30.8-46.4	26.10-28.00	10.5-14.8
Hemoglobin (g dL^{-1})	7.07 ± 0.94	7.70-8.10	Lake: 5.7-13.3 Sea: 8.9-12.7	7.60-8.20	10.5-14.8
MCV (fL)	95.89 ± 19.72	98.2-107.5	Lake: 96.0-137.0 Sea: 103.2-128.0	134.8-141.2	534.0-551.0
MCH (10^6 - pg)	28.30 ± 6.41	26.4-28.0	Lake: 25.7-34.4 Sea: 27.1-32.9	43.3-42.5	18.6-25.8
MCHC (g dL^{-1})	29.82 ± 4.46	22.6-25.0	Lake: 21.2-31.8 Sea: 23.2-28.9	29.0-30.9	39.5-43.0
WBC (10^5 μL^{-1})	1.28 ± 2.20	-	Lake: 1.6-2.1 Sea: 1.3-3.1	-	0.7-0.8
Lymphocytes (10^5)	1.26 ± 0.22	4.5-5.2	-	-	-
Monocytes (10^3)	1.73 ± 1.16	3.7-5.1	-	-	-
Neutrophils (10^2)	1.26 ± 3.57	4.1-5.0	-	-	
Thrombocytes (10^4 μL^{-1})	1.85 ± 0.87	-	-	-	-

Data presented as mean ± standard deviation. Reference values presented as minimum-maximum value. A: Ranzani-Paiva, 1997. B: Fazio et al., 2013. C: Akbary and Jahanbakhshi, 2016. D: Akbary et al., 2018.

2.1.3.4 Shrimp and mullet performance

After 53 days of rearing, the integration of shrimp with mullet did not influence shrimp production parameters (Table 4), which were similar to results published by other authors (Schveitzer et al., 2013; Ray and Lotz, 2017; Rodrigues et al., 2018; Poli et al., 2019).

In the present study, mullets grew, on average, 5.53 g during the experimental period, even though they were fed with only 1% of initial biomass, suggesting that mullets also consumed bioflocs. Mullets had >90% rate of survival in this integrated system, as had been observed by Vinatea et al. (2018) in a biofloc system. Mullet survival in the integrated

culture of bioflocs in the present work was, however, above that observed by Melo et al. (2016) in the polyculture of *Mugil curema* and shrimp (*Litopenaeus schmitti*).

Table 4. Zootechnical performance of shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

	SHRIMP+MULLET	**SHRIMP**	***P***
Shrimp performance			
Mean final weight (g)	12.54 ± 0.30	12.58 ± 0.15	0.83
Survival (%)	92.13 ± 2.50	91.50 ± 3.70	0.79
Feed Conversion Ratio	1.76 ± 0.16	1.87 ± 0.15	0.33
Specific Growth Rate (g week $^{-1}$)	1.19 ± 0.08	1.21 ± 0.08	0.78
Final biomass (kg)	2.31 ± 0.06	2.30 ± 0.12	0.91
Yield (kg m^{-3})	2.60 ± 0.06	2.59 ± 0.07	0.91
Mullet performance			
Mean final weight (g)	21.45 ± 3.20	-	-
Survival (%)	91.11 ± 10.18	-	-
Feed Conversion Ratio	1.34 ± 0.12	-	-
Specific Growth Rate (g week $^{-1}$)	0.71 ± 0.05	-	-
Final biomass (kg)	0.29 ± 0.06	-	-
Yield (kg m^{-3})	3.26 ± 0.65	-	-
Total – combined			
Total final biomass (kg)	2.59 ± 0.03*	2.39 ± 0.16*	0.01
Total yield (kg m^{-3})	2.91 ±0.03*	2.59 ± 0.13*	0.01

Data presented as mean ± standard deviation. * Indicate statistical differences by the *T* test ($p < 0.05$).

The apparent feed conversion (FCR) of the mullets in this experiment was, on average, 1.34, lower than in conventional rearing systems, where FCR values between 3.6 to 5.6 have been reported (FAO, 2018b). Therefore, as noted above, the mullets probably consumed the bioflocs present in the water, prompting us to ask whether fish could grow without any artificial feed, using only the bioflocs available in the culture water as food. We note that commercial diets are not yet balanced with the requirements for mullet, and since the fish in the present study were fed diets formulated for juvenile shrimp, it is possible that their growth could have been greater had they been fed a diet formulated specifically for them. In addition, a higher fish yield was obtained, 3.26 ± 0.65 kg m^{-3} (Table 4), than in another study in polyculture that obtained a maximum fish biomass of 0.53 kg m^{-3} (Hoang et al., 2018). These increase in fish yield resulted from a higher stocking density that is possible through the use of biofloc technology. The only study with BFT that resembles the present work used polyculture of *Litopenaeus schmitti* and *Mugil curema*, and obtained only 875 kg ha^{-1} (Melo

et al., 2016); however, it used earlier stage in the life cycle (fish started at 0.9 g and finished at 15 g).

In the integrated shrimp and mullet system, it was possible to increase animal productivity (Shrimp+Mullet) by 11.9% when compared to the shrimp treatment (Table 4). Based on production performance, future work might assess whether it is possible to increase fish density in the integrated system to further increase the system's efficiency.

2.1.3.5 Nitrogen and phosphorus recovery

Animals cultivated in aquaculture fix in their tissues approximately 27% of the nitrogen of the feed offered (Crab et al., 2007), the rest being lost in effluents and also representing economic losses. In the present study, we observed that nitrogen retention in the system was the same in both treatments (Table 5), which means that the shrimp and mullet together in the biofloc system fixed an average of 27.9% of nitrogen offered in the feed. Therefore, increasing fish biomass in the integrated system with shrimp may improve nitrogen utilization, as was observed in the integrated system with tilapia reported by Poli et al. (2019).

Table 5. Nitrogen and phosphorus recovery for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

Parameter	Shrimp+Mullet	Shrimp	*P*
Nitrogen recovery (%)	28.1 ± 0.37	27.7 ± 2.19	0.75
Phosphorus recovery (%)	11.1± 0.54*	9.5 ± 0.74*	0.03

Data presented as mean ± standard deviation. * Indicate statistical differences by the *T* test ($p < 0.05$).

Another nutrient present in feed is phosphorus, a major cause of water eutrophication. Shrimp fix 6 - 21% of phosphorus from feed (Avnimelech, 2012), and fish fix another 27.3% (Crab et al., 2007; Avnimelech, 2012). Phosphorus retention found in the present study was 16.8% higher in the Shrimp+Mullet treatment than in the Shrimp treatment (Table 5), likely resulting from deposit of phosphorus in the bone structure of the fish, as observed by Hoang et al. (2018) and Poli et al. (2019). Thus, species integration increases phosphorus retention, may decrease environmental impact, and generates fish biomass that can be harvested for human food or as an ingredient for animal feed.

Nitrogen and phosphorus mass balance

The nitrogen in the Shrimp+Mullet treatment was, on average, 5.2% higher, mainly due to the extra input of fish biomass and feed intake by the fish (Table 6). At the end, 3% of the total system nitrogen was represented by the mullet in the Shrimp+Mullet system (Fig.4, A). Nitrogen in the effluents was statistically the same (Table 6), which means that it is

possible to produce more biomass with the same volume of water without increasing the contaminant load. If fish biomass is increased, nitrogen utilization may also be higher, as was observed in integration of shrimp production with tilapia (Poli et al., 2019). If fish take advantage of bioflocs, it might be possible to eliminate feed intake for the fish altogether, but empirical studies are needed to assess this possibility.

Phosphorus causes eutrophication of environments, mainly from low retention by reared organisms (Crab et al., 2007; Avnimelech, 2012). At the end of our experiment, we observed that the total phosphorus was 6.7% higher in the Shrimp+Mullet treatment (Table 7), and that phosphorus was incorporated by the fish instead of being dissolved in water (Fig 4, B). The effluent phosphorus did not increase in the Shrimp+Mullet treatment (Table 7). Thus, the integration of shrimp and mullet does not influence the phosphorus content in the effluent, allowing productivity increase (Table 4).

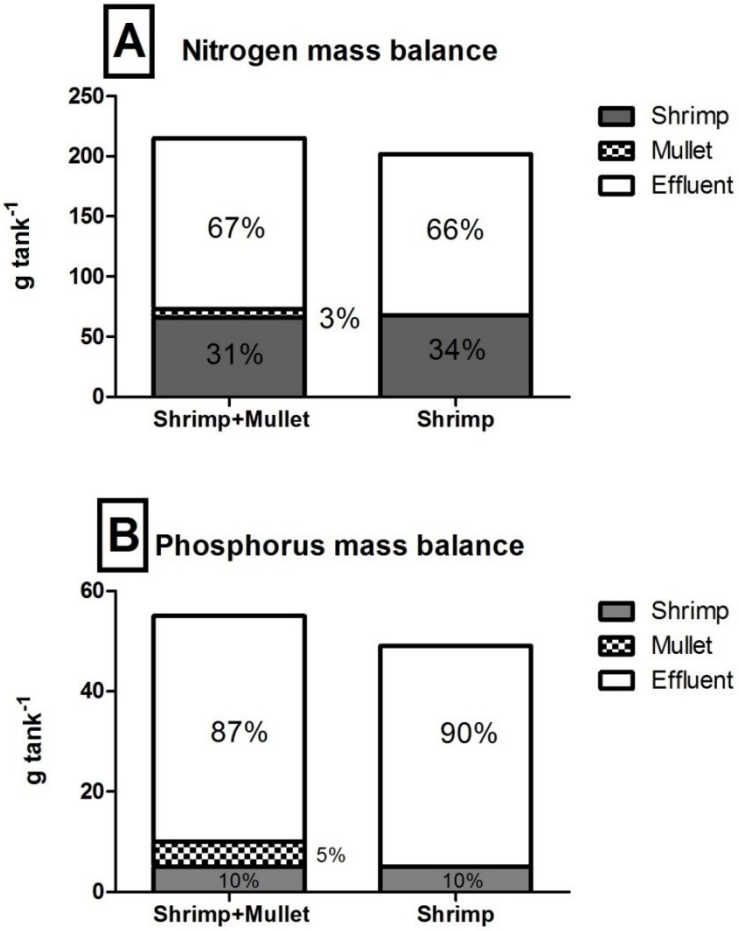
Table 6. Nitrogen mass balance for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

N input	Shrimp feed (g tank^{-1})	Shrimp (g tank^{-1})	Mullet feed (g tank^{-1})	Mullet (g tank^{-1})	Total initial (g tank^{-1})
Shrimp+Mullet	183.62 ± 0.91	18.34 ± 0.17	6.16 ± 0.73	5.20 ± 0.76	214.42 ± 2.35 *
Shrimp	183.75 ± 1.21	18.24 ± 0.24	-	-	203.43 ± 1.20 *
P	0.88	0.42	-	-	<0.05
N output		Shrimp (g tank^{-1})	-	Mullet (g tank^{-1})	Effluent (g tank^{-1})
Shrimp+Mullet	-	66.43 ± 1.4	-	6.56 ± 1.43	142.30 ± 3.44
Shrimp	-	67.72 ± 4.7	-	-	134.27 ± 5.77
P	-	0.77	-	-	0.09

Table 7. Phosphorous mass balance for shrimp and mullet grown in a biofloc system integrated with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp) for 53 days.

P input	Shrimp feed (g tank^{-1})	Shrimp (g tank^{-1})	Mullet feed (g tank^{-1})	Mullet (g tank^{-1})	Total initial (g tank^{-1})
Shrimp+Mullet	46.87 ± 0.26	1.52 ± 0.02	1.68 ± 0.20	1.93 ± 0.28	51.87 ± 1.90 *
Shrimp	46.91 ± 0.31	1.51 ± 0.02	-	-	48.42 ± 0.31 *
P	0.88	0.42	-	-	< 0.05
P output	-	Shrimp (g tank^{-1})		Mullet (g tank^{-1})	Effluent (g tank^{-1})
Shrimp+Mullet		5.07 ± 0.23		2.58 ± 0.79	45.31 ± 1.47
Shrimp		4.88 ± 0.19		-	43.53 ± 0.49
P		0.17		-	0.12

Fig 4. Total nitrogen (A) and phosphorus (B) in grams per experimental unit and percentage in each component after 53 days of cultivation in a integrated biofloc system with *Litopenaeus vannamei* plus *Mugil curema* (Shrimp+Mullet) and a biofloc system with shrimp without mullet (Shrimp).



2.1.4 Conclusion

The experimental findings show that the integration of juvenile mullet with shrimp in biofloc systems increased productivity by 11.9% and the retention by phosphorus of the system by 16.8%, thus increasing the overall efficiency of the system. In addition, mullets can be kept in biofloc systems with restricted feed without impairing their hematological and immunological parameters. In addition, we recommend reproducing this integrated system over a longer-period and at commercial-scale studies, supporting an economic analysis.

2.1.5 Acknowledgments

We thank the Pós-graduação em Aquicultura of the Universidade Federal de Santa Catarina PPGAQI/UFSC program and both the LCM and NEPAQ laboratories. We thank David, "Motor" and Diego for help in fishing for mullets. We thank those who helped us with daily management, water quality analysis, and hematological and immunological analyses:

Isabela Pinheiro, Fernando Dutra, Eliza Martinez, Angela Kugelmeier, Gabriel Alves Jesus and Lúvia de Sá.

2.1.6 Funding sources

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The scholarship was to the first author. This work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Projeto Universal CNPq/425707/2018-0. Felipe Vieira and Mauricio Laterça received productivity research fellowships from CNPq (process numbers PQ 305357/2017-4 and 305869/2014-0, respectively).

2.1.7 References

Akbary, P., Jahanbakhshi, A., 2016. Effect of starvation on growth, biochemical, hematological and non-specific immune parameters in two different size groups of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Acta Ecologica Sinica 36, 205-211. https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2016.04.008

Akbary, P., Sartipi Yarahmadi, S., Jahanbakhshi, A., 2018. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. Environmental Science and Pollution Research 25, 1800-1808. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0582-1.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T., 2000. Effects of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Science 66, 1068-1075.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, and Water Environment Federation, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. ed. Washington, DC, USA. ISBN 0875530478.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Avnimelech, Y., 2012. Biofloc Technology – A Practical Guide Book, 2d Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, United States. doi:10.13140/2.1.4575.0402

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology 5, 771-781. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x

Boyd, C.E., 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. Elsevier, Amsterdam.

Boyd, C.E., 2017. General relationship between water quality and aquaculture performance in ponds, in: Fish Diseases: Prevention and Control Strategies. Elsevier, Amsterdam, pp. 147–166. doi:10.1016/B978-0-12-804564-0.00006-5

Cerozi, B.S., Fitzsimmons, K., 2017. Phosphorus dynamics modeling and mass balance in an aquaponics system. Agricultural Systems 153, 94–100. https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.020

Chopin, T., Robinson, S., MacDonald, B., Haya, K., Page, F., Ridler, N., Szemerda, M., Sewuster, J., Boyne-Travis, S., 2006. Integrated multi-trophic aquaculture: Seaweeds and beyond... The need of an interdisciplinary approach to develop sustainable aquaculture. Journal of Phycology 42, 11.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture 270, 1-14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006

Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257, 346-358. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019

FAO, 2018a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 210. http://www.fao.org/documents/card/es/c/I9540EN/

FAO, 2018b. Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System: Flathead grey mullet - Supplemental feeds & feeding. Food and Agriculture Organization of the United Nations , Rome. http://wwwfaoorg/fishery/affris/species-profiles/flathead-grey-mullet/supplemental-feeds-feeding/en/ (accessed 22/11/2018).

Fazio, F. 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. Aquaculture 500, 237-242. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.10.030

Fazio, F., Marafioti, S., Torre, A., Sanfilippo, M., Panzera, M., Faggio, C., 2013. Hematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*: effect of two different habitats. Ichthyological Research 60, 36-42. https://doi.org/10.1007/s10228-012-0303-1

Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. Methods of Seawater Analysis, second ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

Hoang, M.N., Nguyen, P.N., Le, D.V.B., Nguyen, D.V., Bossier, P., 2018. Effects of stocking density of gray mullet *Mugil cephalus* on water quality, growth performance, nutrient conversion rate, and microbial community structure in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* integrated system. Aquaculture 496, 123-133. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.018

Kakoolaki, S., Akbary, P., Zorriehzahra, M.J., Salehi, H., Sepahdari, A., Afsharnasab, M., Jadgal, S., 2016. *Camellia sinensis* supplemented diet enhances the innate non-specific responses, haematological parameters and growth performance in *Mugil cephalus* against *Photobacterium damselae*. Fish and Shellfish Immunology 57, 379-385. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.060

König, B., Janker, J., Reinhardt, T., Villarroel, M., Junge, R., 2018. Analysis of aquaponics as an emerging technological innovation system. Journal of Cleaner Production 180, 232-243. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.037

Lieschke, G. J., Trede, N. S., 2009. Fish immunology. Current Biology 19(16), R678-R682. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068

Mariscal-Lagarda, M.M., Páez-Osuna, F., 2014. Mass balances of nitrogen and phosphorus in an integrated culture of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: A short communication. Aquacultural Engineering 58, 107-112. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.12.003

Melo, E.P., Oshiro, L.M.Y., Fugimura, M.M.S., Costa, T.V., Flor, H.R., Santana, N.F., 2016. Monocultivo e policultivo do camarão *Litopenaeus schmitti* e do parati *Mugil curema* em sistema de bioflocos e água clara. Boletim do Instituto de Pesca 42(3), 532-547. https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p532

MPA/MMA (Ministério da Pesca e Aquicultura, Ministério do Meio Ambiente), 2015. Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no sudeste e sul do Brasil. MAPA/MMA, Brasília, DF.

NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC. www.nap.edu.

Oliveira, I.R., Soares, L.S.H., 1996. Food habits of the mullet *Mugil platanus* Gunter, 1880 (Pisces: mugilidae), from Cananeia, São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca 23, 95-104.

Otoshi, C.A., Naguwa, S.S., Falesch, F.C., Moss, S.M., 2007. Shrimp behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities. Global Aquaculture Advocate 2, 67-69.

Pinheiro, I., Arantes, R., Espírito Santo, C.M., Nascimento Vieira, F., Lapa, K.R., Gonzaga, L.V., Fett, R., Barcelos-Oliveira, J.L., Seiffert, W.Q., 2017. Production of the halophyte *Sarcocornia ambigua* and Pacific white shrimp in an aquaponic system with biofloc technology. Ecological Engineering 100, 261-267. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.12.024

Poli, M.A., Legarda, E.C., de Lorenzo, M.A., Martins, M.A., Nascimento Vieira, F., 2019. Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. Aquaculture 498, 83-89. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045

Ranzani-Paiva, M.J.T., 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia 14, 329–339. doi:10.1590/s0101-81751997000200007

Ranzani-Paiva, M.J.T.R., Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., Egami, M. I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, Maringá, Paraná, Brazil.

Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture 299, 89-98. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021

Ray, A.J., Lotz, J.M., 2017. Comparing salinities of 10, 20, and 30‰ in intensive, commercial-scale biofloc shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production systems. Aquaculture 476, 29-36. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.047

Rodrigues, M.S., Bolívar, N., Legarda, E.C., Guimarães, A.M., Guertler, C., Espírito Santo, C.M., Mouriño, J.L.P., Seiffert, W.Q., Fracalossi, D.M., Nascimento Vieira, F., 2018. Mannoprotein dietary supplementation for Pacific white shrimp raised in biofloc systems. Aquaculture 488, 90-95. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.025

Samocha, T.M., Schveitzer, R., Krummenaeur, D., Morris, T.C., 2012. Recent advances in super-intensive, zero-exchange shrimp raceway systems. Global Aquaculture Advocate 15 (6), 70–71.

Sampaio, L.A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C., 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 68, 668-674. https://doi.org/10.1007/s001280306

Schveitzer, R., Arantes, R., Costódio, P.F.S., Espírito Santo, C.M., Vinatea, L.A., Seiffert, W.Q.S., Andreatta, E.R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering 56, 59–70. https://doi.org/10.1016/ j.aquaeng.2013.04.006

Silva, A.S.E., Lima, T.A.X., Blanco, B.S., 2012. Hematologia em peixes. Revista Centauro 3, 24 – 32.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis, second ed. Fish. Res. Board Can., Ottawa.

Van-Wyk, P., 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems, in: Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, pp. 125-139.

Van-Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Water quality management, in: Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, pp. 141-161.

Vasconcelos-Filho, A.D.L., Neumann-Leitão, S., Eskinazi-Leça, E., Oliveira, A.M.E.D., 2009. Feeding habits of primary consumers of the icthyofauna from Itamaracá estuarine system (Pernambuco - Brazil). Revista Brasileira de Engenharia de Pesca 4, 21-31.

Vinatea, L., Malpartida, J., Carbó, R., Andree, K.B., Gisbert, E., Estévez, A., 2018. A comparison of recirculation aquaculture systems versus biofloc technology culture system for on-growing of fry of *Tinca tinca* (Cyprinidae) and fry of grey *Mugil cephalus* (Mugilidae). Aquaculture 482, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.041

Zar, J.H., 2010. Biostatistical Analysis, fifth ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

2.2 CAPÍTULO II: CULTIVO DE CAMARÃO EM BIOFLOCOS INTEGRADO COM TAINHA EM DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

Artigo Aceito na revista Aquaculture Research. Fator de impacto: 1.502.

Highlights

- ✓ Integrated shrimp and mullet system increases the yield by 20%.
- ✓ Water use is improved by 17% by the integrated system.
- ✓ 3.7 kg m^{-3} is the limit mullet biomass for integration with shrimp in biofloc
- ✓ Mullet stocking density affects fish performance.

Shrimp rearing in biofloc integrated with different mullet stocking densities

Shrimp rearing in biofloc integrated with different mullet stocking densities

Mullet densities in IMTA with shrimp in BFT

Esmeralda Chamorro Legarda [a], Mateus Aranha Martins [a], Patriula Kaliana Moreira Pereira [a], Ramon Felipe Siqueira Carneiro [a], Isabela Claudiana Pinheiro [a], Walter Quadros Seiffert [a], Claudia Machado [a], Marco Antonio de Lorenzo [a], Felipe do Nascimento Vieira [a*]

[a] Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua dos Coroas 503, CEP 88061-600, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

* Corresponding author. Phone number: 48 3721-4118. E-mail address: felipe.vieira@ufsc.br

Abstract

This work compared different densities of mullets (*Mugil curema*) integrated in the rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a biofloc system. It was evaluated the yield and ecological performance of the system. To accomplish this, we conducted an experiment lasting 55 days, integrating different densities of mullet with shrimp. Fish biomass was estimated in relation to the final shrimp biomass. Four groups were evaluated, as follows: i) T0: shrimp reared without mullet, ii) T10: shrimp reared with 22 fish per tank, iii) T20: shrimp reared with 43 fish per tank, and iv) T30: shrimp reared with 65 fish per tank, each treatment with four replicates. The experimental units consisted of a 1000 L (800 L of useful volume) tank for shrimp rearing and another 100 L tank (90 L of useful volume) for mullet rearing allocated inside a greenhouse. Water recirculated into the mullet tanks via a submerged pump and returned by gravity to the shrimp tanks. Shrimp (initial weight 3.0 ±0.1 g) were stocked at 200 shrimp m^{-3} for all treatments. Mullets (initial weight 7.53 ± 0.96 g) were stocked according to the density calculated for each treatment. The integrated shrimp and mullet system, despites the fish density, increased the yield in 20% when compared with shrimp monoculture system. The sludge:biomass ratio was higher in the T0 treatment, while the T10 - T20 treatments were more efficient. The use of water was 17% more efficient in all treatments with mullet. Shrimp performance was not affected by the increase of fish-stocking density. Mullet survival was higher in the T10 and T20 treatments (mean 84 ± 8%) than in the T30 (61 ± 5%) treatment. Mullet final weight decreased as fish density increased. The final biomass limit in this system was 0.37 kg and yield of 3.7 kg m^{-3}. Finally, we observed that nitrogen outputs were not affected until the T10 treatment. In conclusion, it is possible to integrate mullet up to 3.7 kg m^{-3}, increasing the yield in 20% and decreasing water use in 17%.

Keywords: *Mugil curema*, *Litopenaeus vannamei*, fish density, BFT, loading capacity, sustainability

2.2.1 Introduction

Biofloc technology (BFT) can increase productivity by up to 0.2% of the water amount used per kilogram of shrimp produced in a traditional rearing system (Hopkins et al., 2006; Otoshi ,Naguwa, Falesch & Moss, 2007). This system is based on the formation of microbial aggregates composed of organic matter, phytoplankton, bacteria, rotifers, copepods, and both ciliated and flagellated protozoa (Ray et al., 2010b). These bioflocs help to maintain the nitrogen compounds at levels that would otherwise be toxic to the culture organisms (Avnimelech, 2012). In addition, they can be a source of food for other reared species (Emerenciano, Gaxiola & Cuzon, 2013).

Shrimp recover, on average, 28.5 ± 7.9% of nitrogen (Avnimelech, 2012) and 13.2 ± 4.9% of phosphorus provided by feed (Crab, Avnimelech, Defoirdt, Bossier & Verstraete, 2007; Avnimelech, 2012), and the remainder goes to the water as diluted inorganic compounds or as organic matter. An integrated shrimp and mullet biofloc system can increase phosphorus recovery by 6.7% (Legarda et al., 2019). Therefore, by increasing mullet density, we could increase both nitrogen and phosphorus retention, as Poli, Legarda, Lorenzo, Martins & Vieira (2019a) did when increasing tilapia density in an integrated biofloc shrimp culture. They found that this resulted in an increase of nitrogen and phosphorus retention up to 27.9% and 223%, respectively (Poli et al., 2019a).

The marine shrimp *L. vannamei* is currently cultivated in high-density biofloc systems. Within this system, the total suspended solids (TSS) are removed by decantation (Ray, Lewis, Browdy & Leffler, 2010a) to maintain optimal levels for this species (Schveitzer et al., 2013). This excess of nutrients in the culture system of a species can be harnessed for the cultivation of another species, e.g., tilapia (Poli et al., 2019a; Martins et al., 2020), owing to their nutritional value (Emerenciano et al., 2013).

The integration of species in the same cultivation system called Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA) consists of recycling the residues from the rearing of one specie and converting them to inputs in the form of food or fertilizers for another species. Thus, the term multitrophic refers to the incorporation of species of different trophic levels in the same system (Chopin, 2006).

This system cultured different combinations of fish, molluscs, crustaceans and seaweeds. The composition of these combinations is reflective of the functions cohabiting organism fulfills in the natural ecosystem, as well as their commercial or economic potential and market acceptance (Chopin, 2006). In addition, it has recently been demonstrated that the

integration of the biofloc system with IMTA improves the zootechnical indexes of shrimp and reduces the concentration of ammonia and nitrite in the system (Liu, Hu, Dai & Avnimelech, 2014; Poli et al., 2019a; Poli et al., 2019b; Legarda et al., 2019).

Oliveira and Soares (1996) observed the intestinal tract of mullet from natural environments and observed their eating habit. They found that mullets feed on cyanobacteria, algae, rotifers, polychaete larvae, gastropods, bivalves, crustaceans, trematodes, nematodes and detritus. Although the mullet diet depends on the availability of resources, another study found that they exhibit a preference for benthic microalgae, seaweed, organic debris, vascular plants and benthic invertebrates (Faye et al., 2011). Many of these organisms are found in the microbial aggregates that compose the biofloc (Hargreaves, 2013). The mullet *Mugil curema* is a fish with detritivorous eating habits (Faye et al., 2011). It has distinct market value (Nash & Shehadeh, 1980) and the potential to take advantage of biofloc for growth (Legarda et al., 2019). Additionally, Hoang, Nguyen, Le, Nguyen & Bossier (2018) observed that increasing mullet density in a polyculture with shrimp in clear water improved not only nitrogen and phosphorus recovery, but also water quality and final biomass with gains up to 10% in shrimp biomass.

In this sense, the aim of this work was to evaluate the productivity and the ecological performance of an integrated mullet/shrimp biofloc system by comparing different densities of *M. curema* integrated with *L. vannamei*.

2.2.2 Material and methods

2.2.2.1 Location

The experiment was conducted at the Marine Shrimp Laboratory (LCM), which is part of the Aquaculture Department of the Federal University of Santa Catarina in Florianópolis, Brazil, and lasted 55 days, from June 13, 2018 to August 6, 2018.

2.2.2.2 Biological material

SPEEDLINE HB16 shrimp nauplii (AQUATEC, State of Rio Grande do Norte, Brazil) were maintained in a biofloc system until reaching the initial weight of the experiment (3.0 ± 0.1 g).

From April to May 2018, mullet specimens were collected at the Lagoa da Conceição, Florianópolis, Brazil (IBAMA/ICMBio permit 34842143), acclimated in tanks

with constant water renewal and adapted to artificial feed (STARTER 45, NUTRIPISCIS). After acclimation, 520 mullets were stocked in twelve 90 L tanks. This work was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFSC (Protocol n° 798130617).

2.2.2.3 Experimental units, experimental design and system management

Experimental units consisted of a 1000 L (800 L of useful volume) tank for shrimp rearing and a 100 L tank (90 L of useful volume) for mullet rearing, both round-shaped and located inside a greenhouse.

Water circulated through a submerged pump (Sarlo-Better, 650 L $hour^{-1}$) to the mullet tank and returned by gravity to the shrimp tank. The shrimp rearing unit had an 800 W heater, a thermostat to maintain the temperature at 28 ± 1 °C, a microperforated hose and a blower aeration system to keep the biofloc in suspension and maintain oxygen above 5 mg L^{-1}. Shrimp tanks were also equipped with four artificial substrates (high-density 100% polyester Needlona®, RENNER TEXTIL LTDA, Cachoeirinha, Brazil), having a vertically oriented and rectangular design (0.40×0.55 m), which corresponded to 80% of the surface area of the tank, as recommended for increasing shrimp density in a biofloc system (Schveitzer et al., 2013). The mullet tanks had a 100 W heater, a thermostat to maintain the temperature at 28 ± 1°C, and four air stones. The mullet tanks had artificial substrate (Needlona®) vertically oriented and rectangular in design (0.38×0.43 m). No water exchange occurred during the experiment. Fresh water was added only to replace water lost by evaporation and seawater lost by the removal of sludge. Alkalinity control was performed by the addition of calcium hydroxide at the rate of 20% of the feed inputs per day to keep alkalinity above 120 mg L^{-1}. Conical settling tanks (90 L) were used to remove excess sludge and to maintain TSS concentration between 400 and 600 mg L^{-1} (Schveitzer et al., 2013; Ray et al., 2010a).

At start of the experiment was transferred 800 L of biofloc for each experimental unit from matrix tank with the follow characteristics: ammonia 0.3±0.1 mg L^{-1}; nitrite 0.2±0.0 mg L^{-1}; nitrate 6.5±0.8 mg L^{-1}; alkalinity 131,3±4.4 mg L^{-1}; pH 7.4; salinity 34.8 g L^{-1}; orthophosphate 1.0±0.0 mg L^{-1}; total suspended solids 217.9±44.2 ; volatile 31.7±3.0% and fixed 68.3±3.0%. Before to connect the integrated system mullets was stocked in seawater in 90 L tanks.

Shrimp were reared at a density of 200 shrimp m^{-3} (160 shrimp $tank^{-1}$) in all experimental units.

The experimental design consisted of four treatments corresponding to four levels of mullet stocking density, one of which stocked no fish at all (zero point). The mullet densities were determined based on the estimated shrimp and fish final biomass ratio. To make this estimation, it was assumed that a survival of 90% of the 160 shrimp stocked per tank would be obtained at the end of rearing and that the average final mean weight would be 12 g. Based on these predictions, the shrimp estimated final biomass, calculated according to Poli et al. (2019a), was 2160 g. Based on the calculated shrimp biomass and the assumption that mullet would reach the estimated average final weight of 10 g, the following densities were determined and evaluated:

T0 – No mullet were stocked in the control tanks; however, recirculation with the shrimp tank was maintained.

T10 – The final mullet biomass was assumed to correspond to 10% of shrimp estimated final biomass (SEFB), resulting in an estimated 216 g of mullet per tank at the end of the experiment. Thus, the initial density of mullet per tank was calculated as follows: initial density = final mullet biomass (216 g)/mullet final weight (10 g). Therefore, the initial density was 22 fish per tank.

T20 - The final biomass of mullet was assumed to correspond to 20% of the estimated final biomass of shrimp. Using the equation above, the density in this treatment was 43 fish per tank.

T30 - The final biomass of mullet was assumed to correspond to 30% of the estimated final biomass of shrimp, resulting in 65 fish per tank based on the equation used in the T10 treatment.

2.2.2.4 Feed management

Shrimp were fed four times a day (8:30, 11:30, 14:30 and 17:00) with a commercial feed containing 35% of crude protein (Guabi-Poti Mirim 1.6 mm). We used a feeding table to calculate the feeding rate (Van Wyk, 1999). A feeding tray was used to check for leftovers. Each week a sample of 20 shrimp from each tank was weighed to adjust the amount of feed.

Mullet were fed with 45% crude protein containing commercial feed (Nutripiscis Starter 45) once a day at the rate of 1% of their initial biomass to stimulate biofloc consumption. At the experimental midpoint all mullets from each tank were weighed and the feed adjusted.

2.2.2.5 Water quality

The temperature and dissolved oxygen were measured twice a day with an YSI Pro 20 meter in the shrimp and fish tanks. The alkalinity (Titration) (American Public Health Association -APHA, American Water Works Association &Water Environment Federation, 2005-2320 B), pH (Tecnal pH-meter) and salinity (EcoSense® EC300A) were measured twice a week. Ammonia (TAN) was measured using the indophenol with trione method, according to Grasshoff, Ehrhardt & Kremling (1983). Nitrite ($N\text{-}NO_2$) was measured by the Griess reaction method (Strickland and Parsons, 1972). TSS, volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) were analyzed twice a week by the gravimetric method (APHA et al., 2005-2540 E). Nitrate (Hach's NitraVer 5 nitrate reagent powder pillows) and orthophosphate (4500-P C colorimetric method) (APHA et al., 2005) were analyzed at the beginning, middle and end of the experiment.

2.2.2.6 Sludge produced

We aimed to maintain TSS between 400 and 600 mg L^{-1}, a range considered suitable for *L. vannamei* (Schveitzer et al. 2013), and excess solids were removed using a conical settling chamber. The removed solids were quantified considering the volume of sludge removed and the concentration of TSS in the sludge. To quantify the volume of sludge removed, graded buckets were used, and the concentration of TSS in the sludge was measured according to APHA et al. (2005).

At the end of the experiment, the total amount of sludge produced in each experimental unit was measured by the following equation: *Sludge produced* (g $tank^{-1}$) = $[((TSS\ final \times V_1)-(TSS\ initial \times V_1)/1000) + (\sum(TSS\ Sludge \times V_2))]$, where V_1 corresponds to the volume of the tank in liters, *TSS final* is the concentration of TSS at the end of the experiment, *TSS initial* is the concentration of suspended solids at the beginning of the experiment, *TSS Sludge* is the concentration of total suspended solids in the sludge removed, and V_2 is the volume of sludge removed (measured with volumetric buckets).

Sludge:biomass ratio represents the sludge produced per total final biomass, and it was measured as *Sludge:biomass ratio = Sludge produced* (kg)/ *Total biomass* (kg).

2.2.2.7 Water use and resources

At the beginning of the experiment, we used 800 L of biofloc inoculum from a shrimp nursery tank and 90 L of seawater for all experimental units. The sum of these two

volumes (890 L) was considered as the initial water. We replenished the evaporated water twice a week with freshwater. All feed and calcium hydroxide inputs were also recorded for each experimental unit. At the end of the experiment, were calculated the water used per total biomass = (inoculum+seawater+freshwater (L)/total biomass (kg). Finally, the carbon: nitrogen ratio was calculated considering 50% of carbon in fish and shrimp feed, and 16% of nitrogen in each percentage of feed protein.

2.2.2.8 Shrimp and fish performance

Shrimp performance was evaluated by weighing samples of 20 shrimp on a weekly basis. At the end of the rearing period, survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR), productivity (kg m^{-3}), and weekly growth (g $week^{-1}$) were assessed.

Fish were weighed at the beginning, middle and end of the experiment. Mullet performance was evaluated by measuring survival (%), final mean weight (g), apparent feed conversion ratio (FCR), and productivity (kg m^{-3}).

Final biomass and productivity of shrimp plus mullet were also evaluated. The total biomass produced (shrimp + mullet) was divided by the total volume of the system (800 L of the shrimp tank + 90 L of the fish tank).

2.2.2.9 Nitrogen and phosphorus recovery

At the beginning of the experiment, we collected three shrimp and mullet samples (100 g each sample) from the original tanks (where the animals came from), and at the end of the experiment 100 g of shrimp and mullet samples from each replicate were collected. To determine the concentration of total nitrogen, the Kjeldahl (NTK) method was used, while for total phosphorus content, the colorimetric method was employed, using the methodology described by AOAC (2005) with whole animals.

The recovery of nitrogen and phosphorus was calculated according to the respective equations provided by NRC (2011): *Recovery* (%) = [(final weight X final nutrient (N or P)) – (starting weight X initial nutrient (N or P) x 100]/nutrient input - feed (N or P).

At the beginning and end of the experiment, water samples were collected to quantify the concentration of N and P (APHA et al., 2005). Each time the settling chamber was connected, a sample of the sludge removed was also collected for analysis of total nitrogen (APHA et al., 2005- 4500 N C) and total phosphorus (APHA et al., 2005- 4500-P E).

2.2.2.10 Nitrogen and Phosphorus mass balance

Initial biomass of shrimp and mullet, feed inputs for shrimp and fish, as well as their respective nitrogen and phosphorus contents, were considered as nutrient inputs. The outputs were final nitrogen and phosphorus contents of shrimp and mullet, their biomass and effluent. Nitrogen and phosphorus of the effluent were calculated as the total nitrogen or phosphorus of the input as 100% (Cerozi & Fitzsimmons, 2017) minus the nitrogen and phosphorus from final shrimp and mullet biomass. For each item, the biomass was multiplied by the nitrogen and phosphorus contents at the beginning and end of the experiment (Cerozi & Fitzsimmons, 2017).

2.2.2.11 Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test (Zar, 2010) when necessary, was applied, using a significance level of 0.05. Normality and homoscedasticity were evaluated by the Shapiro-Wilk and Levene tests (Zar, 2010), respectively. Percentage data analysis (survival, VSS and FSS) was subject to angular transformation.

2.2.3 Results and discussion

2.2.3.1 Water quality

Average temperature (27.4 ± 0.3°C), dissolved oxygen (5.9 ± 0.1 mg L^{-1}), salinity (33.1 ± 0.5 g L^{-1}), and pH (8.02 ± 0.03) were maintained at optimal production levels for these species in all treatments.

Alkalinity was higher in the T0 treatment (Table 8) compared to the other treatments. Nitrification consumes alkalinity (as $CaCO_3$) to oxidize the nitrogenous waste (Ebeling, Timmons & Bisogni, 2006). Consequently, it is likely that less feed input in the T0 treatment (only for shrimp, compared to the other treatments with fish - T10, T20 and T30-) than others treatments with fish (T10, T20 and T30) (Table 10) could be related to its high alkalinity by the reduced nitrogen oxidation. Levels of ammonia nitrogen (NAT-N) and nitrite (NO_2-N) were similar among all treatments (Table 8), however, nitrate, the final product of oxidation (Ebeling et al., 2006), was highest in the T30 treatment and lowest in the T0 treatment(Table 1), corroborating the higher nitrifying activity in treatments with higher nitrogen intake (T10, T20 and T30), as also observed with the alkalinity consumption. Additionally, orthophosphate increased in proportion to fish-stocking density (Table 8), probably as a result of increased feed input (Table 10).

Table 8. Physical and chemical water quality variables for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days.

	T0	T10	T20	T30	p ANOVA
Alkalinity (mg L^{-1})	145.50 ± 2.79 [a]	136.81 ± 1.25 [b]	135.44 ± 3.11 [b]	134.31 ± 2.52 [b]	< 0.01
NAT-N (mg L^{-1})	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.07	0.20 ± 0.03	NS
Nitrite NO_2 – N (mg L^{-1})	0.21 ± 0.10	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.07	0.46 ± 0.32	NS
Nitrate NO_3^{2-} – N (mg L^{-1})	9.03 ± 0.58 [b]	10.73 ± 1.21[ab]	10.10 ± 0.54 [ab]	11.37 ±1.37 [a]	0.04
Orthophosphate (mg L^{-1})	1.55 ± 0.05 [c]	1.89 ± 0.03 [b]	2.06 ± 0.08 [a]	2.13 ± 0.09 [a]	< 0.01

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical differences by the Tukey test ($p < 0.05$). NS: not significant. T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

2.2.3.2 Sludge produced

Total sludge production for all treatments was, on average, 0.45 ± 0.03 kg per experimental unit. T10 and T20 were more efficient than T0, as these treatments produced more final biomass without affecting sludge production (Table 9). In contrast, the T30 treatment was as efficient as the T0 treatment (Table 9) since final biomass was affected by mullet survival (Table 11). Therefore, it is possible to produce more biomass without increasing sludge production up to T20. Poli et al. (2019a) tested the increase of tilapia densities in an integrated culture with shrimp in a biofloc system and observed that increasing tilapia density did not increase sludge production. Thus, unlike tilapia, the ratio of mullet to shrimp has a limit, as indicated; and we can use the ratio of T20 fish without increasing the production sludge.

Even with the increase of fish-density and resultant higher amount of feed, the amount of TSS remained, on average, 384.86 ± 15.16 mg L^{-1} for all treatments. No significant difference was observed among treatments for either VSS or FSS (Table 9). The mean values for these two variables, considering all treatments, were 37.95 ± 0.37% and 62.05 ± 0.37%, respectively. These percentages are used as a measure of bacterial biomass (Ebeling et al., 2006) and as an indication of which ammonia conversion pathway is being favored, considering that heterotrophic and autotrophic bacteria exhibit different VSS production rates (Ebeling et al., 2006). In this study, the high percentage of fixed solids, when compared to volatile solids, indicates that nitrification bacteria were owing to the chemoautotrophic route.

Table 9. Total sludge produced, sludge:biomass ratio, total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS) for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days.

Parameter	T0	T10	T20	T30	p ANOVA
Total sludge production (kg EU^{-1})	0.49 ± 0.04	0.43 ± 0.07	0.43 ± 0.09	0.47 ± 0.03	ns
Sludge:biomass ratio	0.26 ± 0.02[a]	0.19 ± 0.02[b]	0.19± 0.04[b]	0.20 ± 0.02[ab]	0.01
TSS (mg L^{-1})	381.59 ± 39.75	364.77 ± 18.90	395.48 ± 41.69	397.59 ± 22.39	ns
VSS (%)	37.53 ± 1.41	37.73 ± 0.91	38.32 ± 1.50	38.20 ± 0.81	ns
FSS (%)	62.47 ± 1.41	62.27 ± 0.91	61.68 ± 1.50	61.80 ± 0.81	ns

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical differences by the Tukey test ($p < 0.05$). EU: experimental unit. T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

The final fish biomass/shrimp biomass ratio was 0%, 13%, 19% and 17% for the treatments T0, T10, T20 and T30 treatments, respectively. These percentages were close to the initial estimates, except for T30, which had lower fish survival and lower fish final mean weight (Table 11).

2.2.3.3Water use and resources

Shrimp feed input was, on average, 2450.82 g per experimental unit and similar for all treatments; mullet feed increased with the increase of fish density (Table 10).Calcium hydroxide input was higher in treatments with mullet. During the experiment, an average of 1491 liters of water (inoculum + seawater + freshwater) per experimental unit were used, and the water:total biomass rate was higher in the shrimp plus fish treatments (T10, T20 and T30), indicating the possibility of improving water use in an integrated system. Finally, when we increased the fish density and feed inputs, we also reduce the C:N ratio (Table 10).

Table 10. Total inputs of shrimp and fish feed, calcium hydroxide, seawater, freshwater to total biomass ratio and carbon to nitrogen for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days.

	T0	**T10**	**T20**	**T30**	**p-value ANOVA**
Shrimp feed (g)	2,399.77 ± 36.97	2,452.74 ± 6.70	2,503.17 ± 126.48	2,447.59	0.27
Mullet feed (g)	-	90.53 ± 7.57 [c]	164.88 ± 8.92 [b]	211.03 ± 5.91 [a]	<0.01
Calcium hydroxide (g)	217.25±28.61 [b]	301.00±34.37 [a]	289.75±19.97 [a]	288.75±8.92 [a]	<0.01
Inoculum+Seawater (L EU^{-1})	890	890	890	890	-
Freshwater (L EU^{-1})	609.87±46.91	656.21±35.53	576.31±17.45	561.62±52.38	ns
Water:total biomass (L kg^{-1})	792.75±29.65 [a]	695.64±7.57 [b]	637.42±22.94 [b]	638.78±41.92 [b]	<0.01
C : N ratio	8.22±0.00 [a]	8.17±0.00 [b]	8.13±0.01 [c]	8.11±0.01 [d]	<0.01

Data presented as mean±standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical difference by the Tukey test ($p<0.05$). EU: experimental unit. T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

2.2.3.4 Mullet and shrimp performance

Shrimp performance was not affected by the presence of mullets in the system (Table 11). Final shrimp mean weight was 12.95 ± 0.01 g, mean survival was 93.94 ± 1.46%, mean apparent feed conversion ratio (FCR) was 1.70 ± 0.04, mean growth was 1.22 ± 0.01 g $week^{-1}$, final biomass per experimental unit was 1.94 ± 0.03 kg, and mean yield was 2.42 ± 0.04 kg m^{-3}. These performance parameters were similar for this stage of shrimp rearing in a biofloc system as reported by other authors (Baloi, Arantes, Schveitzer, Magnotti & Vinatea; Pinheiro et al., 2017; Poli et al., 2019a; Poli et al., 2019b; Souza, Cardozo, Wasielesky & Abreu, 2019; Legarda et al., 2019).

Mullet final weight was higher in the T10 treatment compared to the T30 treatment. Final fish weight for the T20 treatment was neither higher nor lower than other treatments (Table 11). Survival was higher in the T10 and T20 treatments than in the T30 treatment (Table 11). Apparent feed conversion rate (FCR) was lower in the T10 treatment than the T20 treatment. Survival in the T30 treatment was lower than the other treatments, as an apparent consequence of decreased biomass during the experiment. For this reason, it was not possible to calculate the FCR for this treatment (Table 11). Weekly growth decreased, as density increased (Table 11). Final biomass and yield were higher in the treatments with mullets than in the control (Table 11), increasing the total biomass production in 20%.

Mullet density affects fish performance. The final weight and FCR were better for the T10 treatment probably for two reasons. First of one the natural food (biofloc) was more available in the T10 than in the T30 treatment. Second, the capacity of area was imitated in the high-density treatment (T30). This indicates that the fish density limit in the integrated biofloc system with shrimp was 20% of final shrimp biomass (43 fish per tank). Therefore, we are the first to report such with mullet density. Heras, Martos-Sitcha, Yúfera, Mancera & Martínez-Rodríguez, (2015) observed that increasing the density in grey was correlated with low growth and high cortisol levels. Therefore, these results showed that T20 is the limit of the mullet density (3.7 kg m^{-3}) when integrated with shrimp in a biofloc system.

Table 11. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei)* and Mullet (*Mugil curema)* performance in an integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days.

	T0%	T10%	T20%	T30%	*p*-value
Shrimp performance					
Final Mean weight (g)	12.97 ± 0.52	13.09 ± 0.35	12.84 ± 0.40	12.91 ± 0.51	0.88
Survival (%)	91.25 ± 0.88	94.22 ± 3.67	94.06 ± 0.36	94.22 ± 2.67	0.24
Apparent feed conversion rate (FCR)	1.71 ± 0.08	1.66 ± 0.13	1.74 ± 0.15	1.68 ±0.05	0.73
Weekly growth (g week^{-1})	1.22 ± 0.06	1.23 ± 0.05	1.20 ± 0.04	1.21 ± 0.06	0.84
Final biomass (kg)	1.89 ± 0.07	1.97 ± 0.10	1.93 ± 0.06	1.95 ± 0.05	0.51
Yield (kg m^{-3})	2.37 ± 0.09	2.47 ± 0.12	2.42 ± 0.08	2.43 ± 0.07	0.51
Mullet performance					
Final mean weight (g)	-	12.84 ± 1.77 ^{a}	10.94 ± 1.09 ^{ab}	9.33 ± 1.12 ^{b}	0.03
Survival (%)	-	89.77 ± 4.35 ^{a}	79.07 ± 7.60 ^{a}	61.03 ± 5.40 ^{b}	<0.01
Apparent feed conversion rate (FCR)	-	1.26 ± 0.37 ^{a}	3.94 ± 1.58 ^{b}	- *	<0.01
Weekly growth (g week^{-1})	-	0.59 ± 0.15	0.42 ± 0.16	0.28 ± 0.07	0.06
Final biomass (kg)	-	0.25 ± 0.04 ^{b}	0.37 ± 0.01 ^{a}	0.37 ± 0.03 ^{a}	<0.01
Yield (kg m^{-3})	-	2.54 ± 0.39 ^{b}	3.69 ± 0.11 ^{a}	3.68 ± 0.32 ^{a}	<0.01
Shrimp + Mullet					
Total final biomass (kg)	1.89 ± 0.07^{b}	2.23 ± 0.12^{a}	2.30 ± 0.07^{a}	2.33 ± 0.05^{a}	<0.01
Total yield (kg m^{-3})	2.13 ± 0.08 ^{b}	2.50 ± 0.13^{a}	2.59 ± 0.07^{a}	2.62 ± 0.06^{a}	<0.01

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical differences by the Tukey test (p < 0.05). * It was not possible to calculate because there was no increase in biomass. ns: Not significant. T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

2.2.3.5Nitrogen and phosphorus recovery

Nitrogen and phosphorus recovery in this study was affected by fish density in the integrated shrimp and mullet biofloc system (Table 12). Nitrogen recovery was higher in the T0 and T10 treatments than the T30 treatment, and phosphorus recovery was less in the T30 treatment, than in the other treatments.

Table 12. Nitrogen and phosphorus recovery in a *Litopenaeus vannamei* and *Mugil curema* integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days.

Parameter	T0	T10	T20	T30	*p*-value
Nitrogen recovery (%)	27.8 ± 1.3 ^{a}	28.1 ± 1.7 ^{a}	25.2 ± 1.6 ^{ab}	23.5 ± 1.6 ^{b}	0.01
Phosphorus recovery (%)	7.4 ± 0.4 ^{a}	8.7 ± 0.6 ^{a}	7.4 ± 0.2 ^{a}	4.9 ± 1.3 ^{b}	<0.01

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical differences by the Tukey test ($p < 0.05$). T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

Our shrimp nitrogen recovery (T0 treatment) results were higher than those of Hoang et al. (2018) who observed 22% of nitrogen recovery in clear water, probably because the biofloc system was more efficient in recovering nitrogen (Liu et al., 2019). This system recycles nitrogen by heterotrophic and nitrifying bacteria (Avnimelech, 2012; Ebeling et al., 2006). However, our results were lower than those obtained in a tilapia and shrimp integrated

biofloc system (Poli et al., 2019a). Contrary to the latter study in which the recovery of nutrients increased linearly as the fish-stocking density increased, we observed that the higher mullet density (T30) significantly decreased nitrogen recovery.

It was also observed that increasing fish density did not affect phosphorus recovery until T20. Hoang et al. (2018) evaluated the same proportion of shrimp/mullet in clear water and found that increasing fish density also increased phosphorus recovery. As a result of both low fish survival and greater amount of fish feed provided, compared to the other treatments, a lower phosphorus recovery was observed in the T30 treatment (Table 11).

2.2.3.6 Nitrogen and phosphorus mass balance

Nitrogen

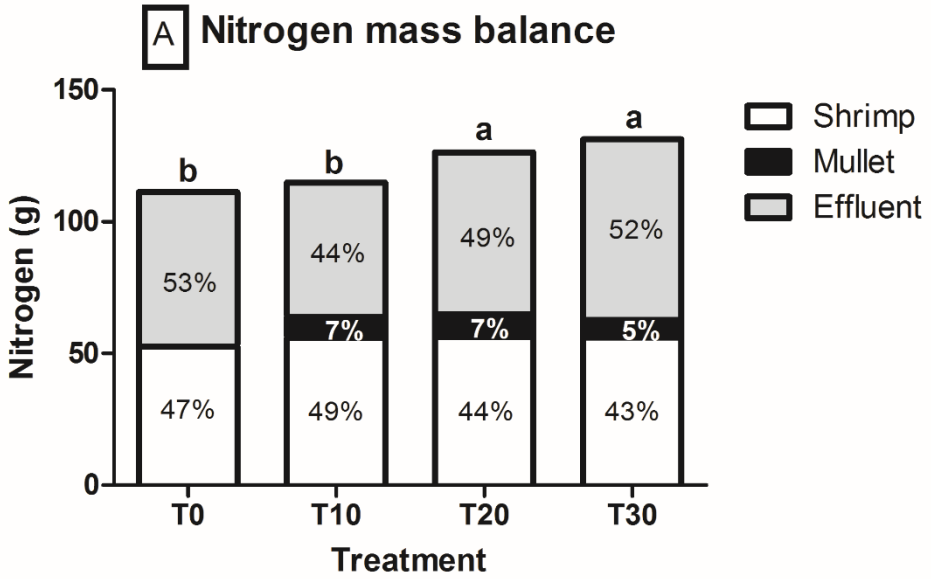
Total nitrogen input increased when fish biomass increased (Table 13). That is explained by both the higher fish biomass and the greater amount of mullet feed. After the experiment, results show that effluent nitrogen in the T10 treatment was the same as that in the T0 treatment (without mullet) (Fig 5 A, Table 13). Mullet density in this integrated shrimp biofloc system was not directly proportional to mullet nitrogen outputs in the system at the end of the experiment (Table 13). Therefore, we can increase ecological efficiency in this integrated system up to T10 since we can increase animal biomass and yield without increasing nitrogen effluents.

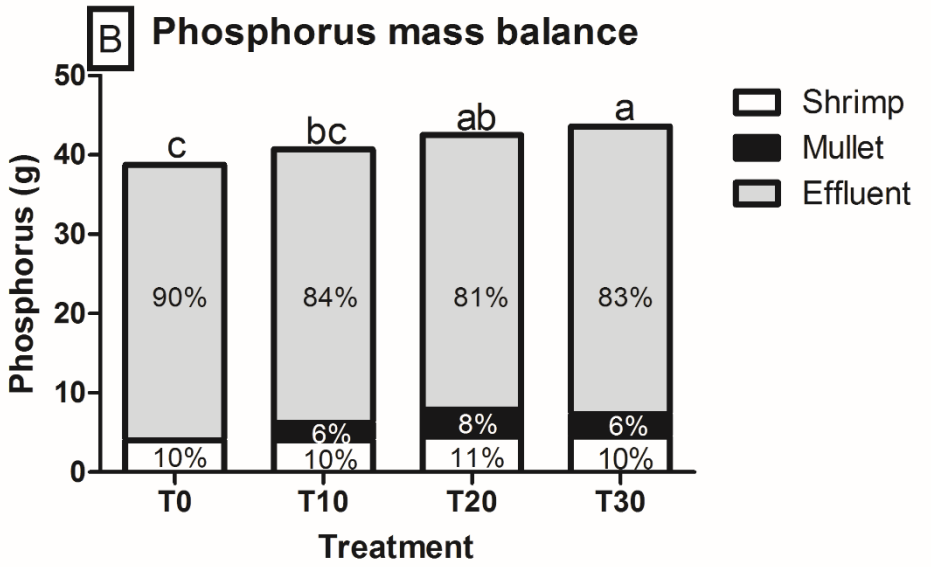
Table 13. Nitrogen mass balance for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days.

Treatment	Shrimp feed	Shrimp	Mullet feed	Mullet	Total initial
N input	(g tank^{-1})	(g tank^{-1})	(g tank^{-1})	(g tank^{-1})	(g tank^{-1})
T0	152.39 ± 2.35	11.50 ± 0.18	-	-	163.88 ± 2.40 ^{c}
T10	155.75 ± 0.43	11.55 ± 0.30	6.45 ± 0.54 ^{c}	4.85 ± 0.86 ^{c}	178.59 ± 1.16 ^{b}
T20	158.95 ± 8.03	11.62 ± 0.21	11.74 ± 0.64 ^{b}	8.83 ± 0.57 ^{b}	191.14 ± 7.25 ^{a}
T30	155.75 ± 1.19	11.54 ± 0.09	15.03 ± 0.42 ^{a}	12.58 ± 4.2 ^{a}	194.90 ± 2.29 ^{a}
p-value	0.273	0.872	<0.01	<0.01	<0.01
N output	-	Shrimp (g tank^{-1})	-	Mullet (g tank^{-1})	Effluent (g tank^{-1})
T0		52.71 ± 2.09		-	58.47 ± 4.22 ^{b}
T10		55.95 ± 2.79		7.85 ± 1.19	50.99 ± 6.21 ^{b}
T20		56.19 ± 1.79		8.59 ± 0.26	61.58 ± 10.30 ^{a}
T30		56.36 ± 1.23		7.38 ± 0.64	67.42 ± 4.12 ^{a}
p-value		0.103		0.199	<0.01

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical difference by the Tukey test ($p<0.05$). T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

Fig 5. A) Nitrogen mass balance where different letters represent significant difference by ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$); B) Phosphorus mass balance where different letters represent significant difference by ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$) in a *Litopenaeus vannamei* and *Mugil curema* integrated biofloc system with different fish stocking densities for 55 days.





Phosphorus

Phosphorus input increased when fish biomass increased (Table 14). This increase in phosphorus occurred as a result of the greater input of mullet biomass and fish feed. However, at the end of the experiment the phosphorus output was higher in the T30 treatment than the T0 and T10 treatments (Figure 5, B). The amount of phosphorus effluent was also not

influenced by mullet density (Table 14). Additionally, phosphorus output in shrimp form was less in the T0 and T10 treatments than in the T20 and T30 treatments (Table 14). This result can be explained by the higher input of fish feed and for the lack of increase in fish final biomass in the T20 and T30 treatments. These results indicate that it is possible to rear mullet and shrimp in an integrated biofloc system without increasing the phosphorus effluent by just using the T10 density.

Table 14. Phosphorous mass balance for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a biofloc system integrated with different fish stocking densities of *Mugil curema* for 55 days.

Treatment *P input*	Shrimp feed (g tank^{-1})	Shrimp (g tank^{-1})	Mullet feed (g tank^{-1})	Mullet (g tank^{-1})	Total initial (g tank^{-1})
T0	41.76 ± 0.64	1.07 ± 0.02	-	-	42.82 ± 0.65 ^{c}
T10	42.68 ± 0.12	1.07 ± 0.03	1.58 ± 0.13 ^{c}	1.62 ± 0.29 ^{c}	46.95 ± 0.38 ^{b}
T20	43.56 ± 2.20	1.08 ± 0.02	2.89 ± 0.16 ^{b}	2.95 ± 0.19 ^{b}	50.47 ± 1.99 ^{a}
T30	42.68 ± 0.33	1.07 ± 0.01	3.69 ± 0.10 ^{a}	4.20 ± 0.48 ^{a}	51.64 ± 0.69 ^{a}
p-value	0.273	0.872	<0.01	<0.01	<0.01
P output	-	Shrimp (g tank^{-1})		Mullet (g tank^{-1})	Effluent (g tank^{-1})
T0		4.05 ± 0.16 ^{b}		-	34.71 ± 0.65
T10		4.00 ± 0.20 ^{b}		2.28 ± 0.35 ^{b}	34.40 ± 0.63
T20		4.52 ± 0.14 ^{a}		3.43 ± 0.10 ^{a}	34.56 ± 2.23
T30		4.55 ± 0.10 ^{a}		3.13 ± 0.27 ^{a}	36.29 ± 0.71
p-value		<0.01		<0.01	0.277

Data presented as mean ± standard deviation. Different letters on the same line indicate statistical difference by the Tukey test (p<0.05). T0: shrimp rearing without mullet. T10: shrimp rearing with 10% fish biomass (22 fish per tank). T20: shrimp rearing with 20% fish biomass (43 fish per tank). T30: shrimp rearing with 30% fish biomass (65 fish per tank).

2.2.4 Conclusions

In conclusion, it is possible to integrate the mullet up to 10% of final shrimp biomass without increasing nitrogen and phosphorus in biofloc effluents. Fish density limit in an integrated biofloc system with shrimp was 20% of the final shrimp biomass (yield = 3.7 kg m^{-3}). In addition, the integration of mullet in shrimp biofloc rearing can reduce the water use (17% less), which was, on average, 611 L kg^{-1} of final biomass. Finally, increasing mullet density in 30% of final shrimp biomass affects nitrogen and phosphorus recovery.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the CNPq [grant numbers: CNPQ 406310/2016-5, 2016]. Felipe Vieira and Walter Seiffert received a productivity research fellowship from CNPq (process numbers 305357/2017-4 and 432271/2018-0,

respectively). We thank the Pós-graduação em Aquicultura of the Universidade Federal de Santa Catarina PPGAQI/UFSC Program and the Laboratório de Camarões Marinhos. We appreciate Presence´s donation of fish feed. We thank David, "Motor" and Diego for help in fishing for mullets. We thank those who helped us with management and water quality analysis: Angela Kugelmeier and Matheus Moreira.

Data Availability Statement

We declare to have data availability and will be provided when requested.

References

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis, eighteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association & Water Environment Federation. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty-first ed. Washington, DC.

Avnimelech, Y. (2012). Biofloc Technology – A Practical Guide Book, (2nd ed.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge. https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402.

Baloi, M., Arantes, R., Schveitzer, R., Magnotti, C.& Vinatea, L. (2013). Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. Aquacultural Engineering, 52, 39-44. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.003.

Cerozi, B.S.,Fitzsimmons, K. (2017). Phosphorus dynamics modeling and mass balance in an aquaponics system. Agricultural Systems, 153, 94–100. https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.020.

Chopin, T. (2006). Integrated Multi-Trophic Aquaculture What it is, and why you should care….. and don't confuse it with polyculture. Northern Aquaculture, 4.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P.& Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture, 270, 1-14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006.

Ebeling, J.M., Timmons, M.B.& Bisogni, J.J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture, 257, 346-358. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.

Emerenciano, M., Gaxiola, G. & Cuzon, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry, in Matovic, M.D. (Ed.), Biomass Now: Cultivation and Utilization. IntechOpen, Rijeka, pp. 301-328. http://dx.doi.org/10.5772/53902

FAO-FIGIS (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Fisheries Global Information System). (2019). Global Aquaculture Production 1950-2016.

http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/es (accessed 14 September 2019).

Faye, D., Tito de Morais, L., Raffray, J., Sadio, O., Thiaw, O.T.& Le Loc'h, F. (2011). Structure and seasonal variability of fish food webs in an estuarine tropical marine protected area (Senegal): Evidence from stable isotope analysis. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 92, 607–617. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.02.017.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (1983). Methods of Seawater Analysis, (2nd ed.) Verlag Chemie, Weinheim.

Hargreaves, J.A. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. SRAC Publ. No. 4503.

Heras, V., Martos-Sitcha, J.A., Yúfera, M., Mancera, J.M.& Martínez-Rodríguez, G. (2015). Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick- lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles. Aquaculture, 448, 29-37. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.033.

Hoang, M.N., Nguyen, P.N., Le, D.V.B., Nguyen, D.V. & Bossier, P. (2018). Effects of stocking density of gray mullet *Mugil cephalus* on water quality, growth performance, nutrient conversion rate, and microbial community structure in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* integrated system. Aquaculture, 496, 123-133. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.018.

Hopkins, J.S., Sandifer, P.A., DeVoe, M.R., Holland, A.F., Browdy, C.L. & Stokes, A.D. (2006). Environmental Impacts of Shrimp Farming with Special Reference to the Situation in the Continental United States. Estuaries, 18, 25. https://doi.org/10.2307/1352281.

Legarda, E.C., Poli, M.A., Martins, M.A., Pereira, S.A., Martins, M.L., Machado, C., Lorenzo, M.A. & Nascimento Vieira, F. (2019). Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. Aquaculture, 512, 734308. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.
734308.

Liu, L., Hu, Z., Dai, X. & Avnimelech, Y. (2014). Effects of addition of maize starch on the yield, water quality and formation of bioflocs in an integrated shrimp culture system. Aquaculture 418-419, 79-86. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.005.

Liu, K., Li, H., Wei, H., Zhu, X., Han, D., Jin, J., Yang, Y. & Xie, S. (2019). Biofloc formation improves water quality and fish yield in a freshwater pond aquaculture system. Aquaculture, 506, 256-269. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.031.

Martins, M.A., Poli, M.A., Legarda, E.C., Pinheiro, I.C., Carneiro, R.F.S., Pereira, S.A., Martins, M.L., Gonçalves, P., Schleder, D.D. & Nascimento Vieira, F., (2020). Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. Aquaculture, 514, 734517. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734517

Nash C. E. & Shehadeh Z. H., 1980. Review of breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus* L. ICLARM Studies and Reviews, 3, 87 pp.

NRC (National Research Council). (2011). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC.

Oliveira, I.R. & Soares, L.S.H. (1996). Food habits of the mullet *Mugil platanus* Gunter, 1880 (Pisces: mugilidae), from Cananeia, São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca 23, 95-104.

Otoshi, C.A., Naguwa, S.S., Falesch, F.C. & Moss, S.M. (2007). Shrimp behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities. Global Aquaculture Advocate, 2, 67–69.

Pinheiro, I., Arantes, R., Santo, C.M.E, Vieira, F.N., Lapa, K.R., Gonzaga, L.V., Fett, R., Barcelos-Oliveira, J.L. & Seiffert, W.Q. (2017). Production of the halophyte *Sarcocornia ambigua* and Pacific white shrimp in an aquaponic system with biofloc technology. Ecological Engineering, 100, 261–267. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.12.024.

Poli, M.A., Legarda, E.C., Lorenzo, M.A., Martins, M.A. & Nascimento Vieira, F., (2019a). Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. Aquaculture, 498, 83-89. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045.

Poli, M.A., Legarda, E.C., De Lorenzo, M.A., Pinheiro, I., Martins, M.A., Seiffert, W.Q. & Nascimento Vieira, F. (2019b). Integrated multitrophic aquaculture applied to shrimp rearing in a biofloc system. Aquaculture, 511, 734274. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734274.

Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L. & Leffler, J.W. (2010a). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture, 299, 89–98. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021.

Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A. & Browdy, C.L., (2010b). Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. Aquaculture, 310, 130-138. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019.

Schveitzer, R., Arantes, R., Costodio, P.F.S., Santo, C.M.D., Arana, L.V., Seiffert, W.Q. & Andreatta, E.R. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering, 56, 59-70. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006.

Souza, J., Cardozo, A., Wasielesky, W. & Abreu, P.C. (2019). Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems? Aquaculture, 500, 443-450. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.051.

Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis, second ed. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.

Van Wyk, P. (1999). Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems, in: Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K.L., Mountain, J. & Scarpa, J. (Eds.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Department of Agriculture and Consumer Services (pp. 125–139). Tallahassee, Florida.

Zar, J.H. (2010). Biostatistical analysis, (5th ed.). Prentice Hall, New Jersey.

2.3 CAPÍTULO III: DESEMPENHO DE *Ulva fasciata* EM UM SISTEMA INTEGRADO DE CAMARÃO E TAINHA EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

Artigo formatado com as normas da revista Journal of Applied Phycology, fator de impacto 2.635

Destaques

- ✓ A retenção de nitrogênio e fósforo no sistema IMTA-BFT foi 5,5% e 7,6% maior com a integração da *Ulva fasciata*, respectivamente.
- ✓ A integração da *Ulva fasciata* no sistema de camarão e tainha no sistema de bioflocos aumenta a biomassa final total e o rendimento em 12,2%.
- ✓ A *Ulva fasciata* cultivada no sistema IMTA-BFT incrementa o teor de proteínas e antioxidantes.

CULTIVO INTEGRADO DE CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO, TAINHA E *Ulva fasciata* EM BIOFLOCOS

E. C. Legarda[1], D. Silva[1], C. Miranda[1], P. K. Moreira[1], M. A. Martins[1], C. Machado[1], M. A Lorenzo[1], L. Hayashi[2], F. N. Vieira[1*]

[1] Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua dos Coroas 503, CEP 88061-600, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

[2] Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas 503 (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil

[*] Autor de correspondência. E-mail: felipe.vieira@ufsc.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da integração de *Ulva fasciata* no cultivo de camarão e tainha em sistema de bioflocos, considerando a qualidade da água, o desempenho animal e da macroalga, a retenção de fósforo e nitrogênio, os compostos bioativos da macroalga e a produção de ulvana. Dois grupos foram comparados: i) o grupo *Ulva*: cultivo integrado de camarão e tainha com macroalga, ii) grupo controle: o mesmo sistema sem macroalga, ambos grupos usando BFT. Cada grupo teve quatro repetições, a biomassa inicial foi 618 g e 246 g para o camarão e para a tainha, respectivamente. Adicionalmente, no grupo *Ulva*, foi trocada a biomassa cada duas semanas. Depois de 55 dias o grupo *Ulva* não teve influência sobre o desempenho do camarão, os camarões cresceram em média 1,22 g semana^{-1}, com 90,6% de sobrevivência, produtividade de 2,91 kg m^{-3} e FCA 1,84. As tainhas cresceram, em média, 1,035 g semana^{-1}, com 99,17% de sobrevivência, e produtividade de 4,08 kg m^{-3}. No final do período de cultivo, 317,01±32,02 g de macroalga por unidade experimental foram colhidos. A biomassa total e a produtividade, considerando o sistema todo, foi 12,2% maior no grupo *Ulva* que no grupo controle. A retenção de nitrogênio e fósforo foram respectivamente 5,5% e 7,6% maiores no grupo *Ulva* que no grupo controle. A concentração de proteína, fósforo, clorofila e carotenoides incrementaram na *Ulva* após o cultivo em bioflocos. A produtividade do extrato de *Ulva* (ulvana) foi 2,74% no início e 2,24% no final do período experimental. Em conclusão, a integração de *Ulva fasciata* incrementa a produtividade e a retenção de fósforo e nitrogênio do sistema de bioflocos. Além disso, a integração de *Ulva fasciata* no sistema pode incrementar a concentração de clorofila e carotenoides sem afetar a produtividade do extrato ulvana.

Palavras-chave: BFT, Aquicultura Multitrófica Integrada, *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza*, macroalga.

2.3.1 Introdução

A aquicultura é o setor de produção animal que mais rápido cresce, de 2013 até 2017 cresceu em média 4% por ano (FAO-FIGIS, 2019). Em 2017 foram produzidos 5,5 milhões de toneladas de camarão que foram valorados em 34 milhões de dólares, *Litopenaeus vannamei* representou 81% desses valores (FAO-FIGIS, 2019). Para acompanhar esse crescimento, a aquicultura precisa intensificar a produção de uma maneira sustentável, mudar da aquicultura extensiva para a intensiva e tornar a produção cada vez mais eficiente em termos energéticos (FAO, 2018). Portanto, a tecnologia de bioflocos (BFT) é uma alternativa de produção para o camarão-branco-do-pacífico em altas densidades de estocagem, com menor uso de área que o sistema convencional (Otoshi et al., 2007; Samocha et al., 2012).

Durante os cultivos intensivos é necessário o uso de uma fonte de alimento externo (ração), do qual os camarões retêm somente uma parte dos nutrientes e o restante é excretado e se mantem na água e em altos níveis pode se tornar tóxico para os animais de cultivo. A fim de manter a qualidade da água em cultivos tradicionais, são feitas renovações de água. No entanto, em sistemas BFT, as bactérias são estimuladas a reciclar alguns compostos inorgânicos dissolvidos na água (Avnimelech, 2012). As bactérias heterotróficas incorporam o nitrogênio e fósforo inorgânico por assimilação, convertendo-o em biomassa celular (McIntosh et al., 2000; Avnimelech et al., 2012) Essas bactérias precisam de uma relação alta de carbohidrato : nitrogênio amoniacal total (~20:1). As bactérias quimioautotróficas oxidam a amônia para nitrito, e o nitrito para nitrato, consumindo $CaCo_3$ da água (Ebeling et al., 2006), sendo necessário manter níveis ótimos de alcalinidade, adicionando carbono inorgânico.

Durante o cultivo em sistema BFT os sólidos suspensos totais (SST) se acumulam, sendo necessário removê-los por meio de decantação (Ray et al., 2010; Schveitzer et al., 2013). Uma abordagem alternativa é recuperar os sólidos como alimento para outros organismos como tainha (Legarda et al., 2019) ou tilápia (Poli et al., 2019), e produzir mais biomassa a partir dos rejeitos da produção de uma espécie. Os compostos inorgânicos dissolvidos resultados dos processos biológicos das bactérias, como o nitrato ou o ortofosfato, se acumulam na água e podem ser removidos por meio de renovação de água ou outra alternativa é aproveita-los como fertilizantes para organismos autótrofos, aplicando os conceitos de Aquicultura Multitrófica Integrada (AMTI).

IMTA é um conceito o qual integra diferentes níveis tróficos no mesmo sistema ambiental, convertendo os resíduos do cultivo de uma espécie em alimento ou fertilizante para outras espécies (Chopin et al., 2001). Esse conceito pode melhorar a sustentabilidade da

aquicultura, reduzindo o efluente e induzindo a diversidade econômica, por meio da produção de outras espécies de valor agregado (Chopin et al., 2001).

A aplicação do IMTA à criação de camarões no sistema bioflocos deve considerar espécies marinhas que possam tirar proveito dos resíduos da criação de camarões. Legarda et al. (2019) observaram que as tainhas podem aproveitar o excedente de bioflocos do cultivo de camarão como alimento; a tainha no ambiente natural consome detritos, nematoides, algas e larvas de poliquetas (Oliveira e Soares, 1996) e muitos desses microrganismos compõem os bioflocos.

A *Ulva* sp. é uma macroalga promissora para os sistemas IMTA, ela tem a capacidade de absorber nitrogênio em diferentes formas (amônia, nitrito, nitrato) da água (Troell et al., 2003), e utiliza-os para o crescimento. O cultivo de *Ulva lactuca* com camarão pode melhorar a qualidade da água no sistema BFT (Brito et al., 2014). Além disso, *Ulva* sp. pode ser utilizada como co-alimento para o camarão (Pallaoro et al., 2017) gerando uma economia circular. *Ulva* sp. tem compostos bioativos como carotenoides e polissacarídeos (ulvana) que têm potencial como prebióticos para os animais aquáticos (Peso-Echarri et al., 2012).

Assim, o presente estudo avaliou o efeito da integração de *Ulva fasciata* no sistema de cultivo de camarão e tainha em bioflocos sobre a qualidade da água, o desempenho animal e algal, a retenção de nitrogênio e fósforo, os compostos bioativos da macroalga e o desempenho da ulvana.

2.3.2 Material e métodos

2.3.2.1 Localização

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), o qual faz parte do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Brasil. O experimento durou 55 dias, do dia 14 de março até o dia 7 de maio de 2019.

2.3.2.2 Material biológico

Camarão

Foram utilizados camarões da linhagem SpeedLine Aqua, obtidos da empresa Aquatech (estado de Rio Grande do Norte, Brasil), e cultivados em tanques de 50.000 L em sistema de bioflocos até atingir o peso inicial de 3,11±0,04 g.

Tainha

Juvenis de tainhas (*Mugil liza*) com peso inicial de 16.37±2,26 g foram doadas pelo Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Macroalga

As macroalgas (*Ulva fasciata*) foram coletadas da Prainha da Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°34'25''S 48°25'15''W), foram limpas manualmente com água de mar para retirar epífitas e animais aderidos, mantidas em aclimatação por uma semana em tanques de 800 L dentro de estufa agricola. A cada duas semanas foram trocadas as macroalgas seguindo o mesmo procedimento para manter a densidade algal em 2 g L^{-1}.

2.3.2.3 Desenho experimental

Foram comparados dois grupos que consistem em i) grupo *Ulva*: um sistema de camarão e tainha com macroalga, e ii) grupo controle: um sistema de camarão e tainha sem macroalga; ambos grupos em sistema de bioflocos. Cada grupo teve quatro repetições.

2.3.2.4 Unidades Experimentais

As unidades experimentais consistiam em um tanque circular de 800 L destinado para o cultivo de camarão, um tanque circular de 90 L para o cultivo de tainha, e um tanque retangular com fundo em U de 60 L para o cultivo da macroalga, todos os tanques alocados dentro de uma estufa agrícola (Figura 6). A água circulava por meio de uma bomba submersa (Sarlo-Better, 650 L h^{-1}) desde o tanque de cultivo de camarão para o tanque de cultivo de tainha, e retornava por meio de gravidade para o tanque de cultivo de camarão. Semanalmente a bomba era desligada, toda a água do tanque das macroalgas era transferida para o tanque de camarão. Do tanque dos peixes se transferiam 15 L de água de bioflocos filtrada (filtro Bag) e era completado o volume do tanque das macroalgas com 45 L de água do mar, para ter uma diluição de 25% de BFT. Finalmente, a bomba era ligada novamente, sendo que esse procedimento era feito toda semana para os dois grupos. Os lodos filtrados voltavam para o tanque dos camarões e se ligava o sistema novamente. Esse procedimento foi realizado com o fim de repor os nutrientes para as macroalgas.

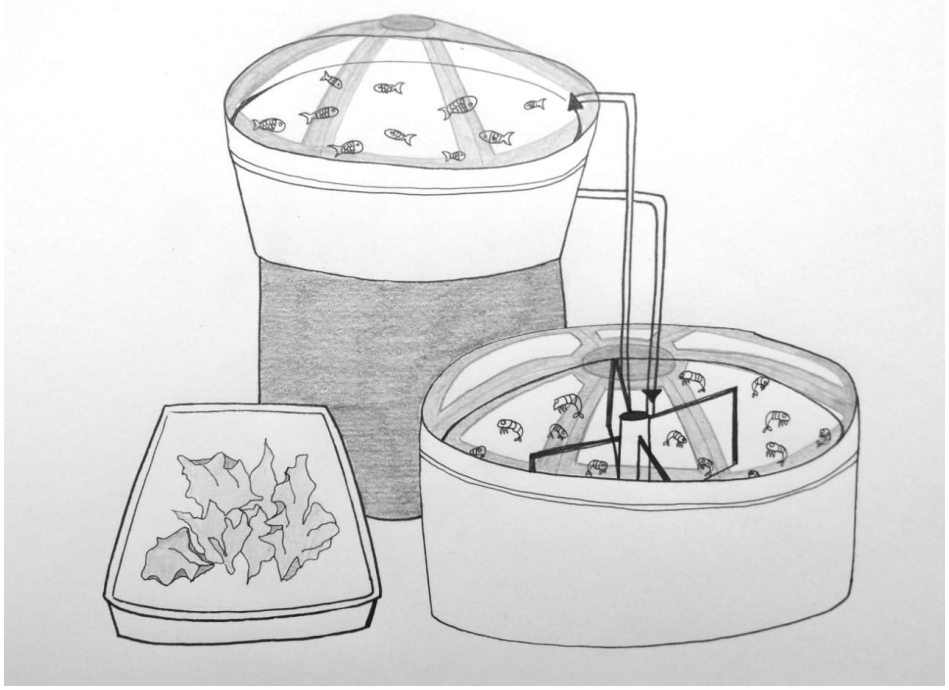
No início do experimento, foram transferidos 800 L de um tanque matriz contendo bioflocos maduro, e as unidades experimentais completadas com água do mar com 33 g L^{-1} de salidanidade. Depois da diluição do inoculo com a água de mar, a água das unidades

experimentais teve as seguintes características: amônia 0,2±0,1 mg L^{-1}, nitrito 0,34±0,02 mg L^{-1}, nitrato 8,4±1,4 mg L^{-1}, pH 8,08±0,01, salinidade 30,48±0,07 g L^{-1}, alcalinidade 131,50±0,71 mg L^{-1}, ortofosfato 1,77±0,02 mg L^{-1}, SST 241±7 mg L^{-1}, SSV 37,97±5,07%, SSF 62,03±5,07%, 9,25 x 10^4 e 1,03 x 10^4 UFC ml^{-1} de bactérias totais e *Vibrio* spp., respectivamente.

O tanque de camarão tinha um aquecedor de 800 W, um termostato para manter a temperatura a 28±1°C, e uma mangueira microperfurada conectada a um sistema de aeração para manter os bioflocos em suspensão e o oxigênio dissolvido acima de 5 mg L^{-1}. O tanque de camarão também estava disposto com quatro substratos artificiais (Needlona®, Renner Textil Ltda; Cachoerinha, Brasil), com forma retangular, orientados verticalmente (Figura 6), esses substratos acrescentaram em 80% a área do tanque. O tanque de tainha estava equipado com um aquecedor de 100 W, um termostato para manter a temperatura em 28±1°C, e quatro pedras porosas conectadas ao mesmo sistema de aeração do tanque dos camarões. O tanque de macroalgas possuía duas pedras porosas.

Não foram feitas renovações de água durante o experimento. Água doce foi adicionada para repor as perdas por evaporação e semanalmente foi completado o volume com 45 L de água de mar. O controle de alcalinidade foi realizado adicionando hidróxido de cálcio para manter a alcalinidade acima de 120 mg L^{-1}.

Figura 6. Desenho esquemático da unidade experimental de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias. Circulação constante entre o tanque de camarão e tainha e semanalmente se diluía 25% da água para o cultivo das macroalgas.



Fonte: desenho realizado por Juliana Chamorro Legarda

2.3.2.5 Povoamento

Os tanques de camarão foram estocados com 200 camarões (250 camarões m^{-3}), o tanque das tainhas foi estocado com 15 tainhas (~167 tainhas m^{-3}, que correspondiam aos 10% da biomassa final de camarão estimado) e cada duas semanas o tanque das macroalgas foi estocado com 120 g de *Ulva fasciata* (2 g L^{-1}). Os tanques do grupo controle não foram estocados com *U. fasciata*, porém, foi feito mesmo manejo da água para ambos grupos.

2.3.2.6 Alimentação

Os camarões foram alimentados com ração comercial com 35% de proteína bruta (Guabitech 1,6 mm Guabi®, Sales Oliveira, São Paulo, Brasil) quatro vezes ao dia de acordo com a tabela de alimentação de Van-Wyk (1999), o consumo de ração foi controlado durante o experimento por meio de bandeja de alimentação. As tainhas foram alimentadas com ração comercial com 45% de proteína bruta (Starter 45, Nutripiscis) somente uma vez ao dia com relação de 1% da biomassa inicial, estimulando que os peixes aproveitem os bioflocos como alimento.

2.3.2.7 Qualidade da água e sólidos

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos duas vezes ao dia com oxímetro YSI Pro 20. A alcalinidade (titulação, APHA et al., 2005-2320B), pH (pH-metro, Tecnal) e salinidade (EcoSense® EC300A) foram medidos duas vezes na semana. A amônia foi medida pelo método de indofenol com trione, de acordo com Grasshoff et al. (1983). O nitrito ($N\text{-}NO_2$) foi medido pelo método de Griess (Strickland and Pearsons, 1972). Os sólidos suspensos totais (SST) foram analisados duas vezes na semana pelo método gravimétrico (APHA et al., 2005-2540E). O nitrato (Hach NItraver 5) e ortofosfato (Metodo colorimétrico 4500-P C, APHA et al., 2005) foram medidos semanalmente. A luminosidade foi medida diariamente em Lux (digital lux-meter Hikari HK-881ª).

Os SST foram mantidos entre 400 e 600 mg L^{-1}, níveis considerados adequados para *L. vannamei* (Schveitzer et al., 2013), e o excesso de sólidos foi removido usando sedimentadores cônicos. A remoção de sólidos foi quantificada considerando o volume de lodos e a concentração de SST nos lodos removidos. Para quantificar o volume de lodos removidos, foram usados baldes graduados, e a concentração e SST nos lodos que foi medida de acordo com a metodologia da APHA et al. (2005).

No final do experimento, a quantidade total de lodos produzida por cada unidade experimental foi calculada por meio da fórmula que segue: *lodos produzidos* (g tanque^{-1}) – [((SST$_{final}$ x V$_1$(/1000) + (Σ(SST$_{lodo}$ x V$_2$))], onde V$_1$ corresponde ao volume da unidade experimental em litros, SST$_{final}$ é a concentração de SST no final do experimento, SST$_{inicial}$ é a concentração dos SST no início do experimento, SST$_{lodos}$ é a concentração de sólidos suspensos totais nos lodos removidos, e V$_2$ é o volume dos lodos removidos (medido com baldes graduados).

A relação lodo:biomassa representa os lodos produzidos por biomassa total final, e foi calculado como lodo:biomassa = lodos produzidos (kg) / Biomassa total (kg).

2.3.2.8 Microbiologia

No início e no final do experimento foram coletadas amostras de 15 ml de água de cada unidade experimental para as análises microbiológicas. As amostras foram homogeneizadas e diluídas em série (1/10) em solução salina estéril (3%) e semeadas em duplicada em meio de cultura ágar marine (Difco) para contagem de bactérias totais. Amostras diluídas foram também semeadas em duplicata em meio de cultura Tiosulfato bili sacarose ágar (TCBS, Difco) para contagem de bactérias do gênero *Vibrio*. As placas semeadas foram incubadas em estufa microbiológica a 30°C. Depois de 24 h foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC).

2.3.2.9 Desempenho do camarão, tainha e macroalga

O desempenho do camarão foi avaliado por meio de pesagens semanais de 20 camarões por cada unidade experimental. Ao final do período de engorda, foi medida a sobrevivência (%), o peso médio final (g), a conversão alimentar aparente (FCA-A), produtividade (kg m^{-3}), e o crescimento semanal (g semana^{-1}).

No início e no final do experimento os peixes foram pesados e medidos. O desempenho das tainhas foi avaliado por meio da sobrevivência (%), peso médio final (g), conversão alimentar aparente (FCA-A), e a produtividade (kg m^{-3}).

As macroalgas foram pesadas no início, semanalmente e no final do experimento. A cada duas semanas a biomassa foi substituída por nova massa algal. Todas as massas que saíram do sistema foram somadas, chamadas de massa final por unidade experimental.

A biomassa final e a produtividade de camarão mais peixe mais macroalga (combinada) também foram avaliadas. A produtividade total foi determinada dividindo o total

de biomassa produzida (Camarão + tainha + macroalga), pelo volume total do sistema (800 L do tanque de camarão + 90 L do tanque das tainhas + 60 L do tanque das macroalgas).

2.3.2.10 Retenção de fósforo e Nitrogênio

Foram coletadas amostras de 100 g de camarão e de tainha no início e no final do experimento. Para determinar a concentração de nitrogênio (N) foi utilizado o método Kjeldal (NTK), enquanto que o fósforo foi determinado utilizando o método colorimétrico, seguindo a metodologia descrita pela AOAC (2005) para animais inteiros.

A retenção de nitrogênio e fósforo foi calculada de acordo com a equação providenciada pela NRC (2011): retenção (%) = [(peso final x nutriente final (N ou P)) – (peso inicial x nutriente inicial (N ou P) x100]/entrada de nutrientes – ração (N ou P).

2.3.2.11 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva fasciata*

Foram coletadas amostras de macroalga no início (uma mescla da massa inicial de cada duas semanas) e no final (um mescla da massa final de cada duas semanas), as amostras foram congeladas, posteriormente liofilizadas a -50°C e 200 µHg (liofilizador L101, LIOBRAS); 500 mg de cada amostra liofilizada foram macerados com 5 ml de metanol 80% (v/v), depois foram incubadas por uma hora no escuro, centrifugadas (12.000 g x 10 minutos), e finalmente o sobrenadante foi coletado para fazer a leitura. O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocateu (λ = 750 ηm), a metodologia está descrita por Schiavon et al., (2012) com modificações. Foi utilizada a curva standard de ácido gálico (Sigma-Aldrich, st. Louis, MO, USA – 100 – 1250 µg ml^{-1}, y = 0.0108X, r^2 = 0.999). Os resultados foram apresentados como µg de ácido gálico equivalente por g de massa.

Para determinar carotenoides e clorofila foram usados 100 µg de massa seca. A macroalga foi macerada com 2 ml de metanol. Depois de 60 minutos incubadas a 4°C no escuro, foram medidas as absorbâncias a 665 e 652 ηm para calcular a clorofila-a (Chla = 16,51 x A665 – 8,0962 x A652); também foi medida a absorbância 450 ηm para calcular ß-caroteno (=[A450/2,704 (µg)] volume /peso, r^2 =0,999), seguindo a metodologia descrita por Porra et al. (1989) e Ritchie (2006).

2.3.2.12 Extração de ulvana

O extrato do polissacarídeo ulvana da *Ulva fasciata* foi feito seguindo a metodologia descrita por Paulert et al., (2009) com modificações. As macroalgas frescas foram autoclavadas seguindo a proporção de 5,1 g de massa fresca para 600 mL de agua destilada por duas horas a 110°C. Em seguida o sobrenadante foi incubado com três volumes de etanol P. A., por 48 h a -20°C. Foi filtrado e liofilizado por 24 h a -54°C e 0,160 mBar. Finalmente foi calculado o rendimento de ulvana usando a seguinte fórmula: rendimento de ulvana = [ulvana seca (g)/macroalga fresca (g)] x 100. Para esse calculo se considerou a ulvana seca obtida da extração e a massa fresca usada no processo.

2.3.2.13 Análise estatística

Foi aplicado o teste-T de student com nível de significância de 0,05. Prévio a esse teste foi comprovada a normalidade e homocedasticidade dos dados por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados de microbiologia foram transformados por logaritmo.

2.3.3 Resultados

2.3.3.1 Qualidade da água, sólidos e microbiologia

A temperatura foi mantida em 28,00±0,05°C, o oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg L^{-1}, o pH em média foi 8,00±0,14, e a salinidade em média 31,6±1,15 g L^{-1} para todas as unidades experimentais. A luminosidade foi natural dento de estufa agrícola com sombreamento de 70%, se manteve em 627 lux. As variáveis de qualidade da água, amônia, nitrito, nitrato, ortofosfato, alcalinidade, SST, lodos produzidos, a relação lodos:biomassa e os resultados microbiológicos não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 15).

Tabela 15. Variáveis físicas, químicas e microbiológicas da água no cultivo integrado em sistema de bioflocos de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* por 55 dias.

Parâmetro	Controle	*Ulva*	*p-valor*
Nitrogênio amoniacal total (mg L^{-1})	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,72
Nitrito N-NO_2 (mg L^{-1})	0,30 ± 0,03	0,33 ± 0,06	0,43
Nitrato N-NO_3 (mg L^{-1})	9,81 ± 1,29	8,78 ± 0,97	0,25
Ortofosfato PO_4^{3-} (mg L^{-1})	2,29 ± 0,18	2,27 ± 0,12	0,88
Alcalinidade (mg L^{-1})	153,94 ± 2,85	151,31 ± 8,80	0,59
SST (mg L^{-1})	385,70 ± 7,04	383,52 ± 22,90	0,86
Produção total de lodos (kg UE^{-1})	0,74 ± 0,06	0,66 ± 0,12	0,28
Lodo:biomassa	0,28 ± 0,02*	0,22 ± 0,04*	0,04
Bactérias totais (LOG_{10} UFC ml^{-1})	5,48 ± 1,02	4,62 ± 0,54	0,20
Vibrio (LOG_{10} UFC ml^{-1})	3,23 ± 0,13	3,42 ± 0,39	0,46

Dados apresentados como média ± desvio padrão. * indicam diferenças pelo teste-t ($p<0,05$). UE: unidade experimental. SST: sólidos suspensos totais.

2.3.3.2 Desempenho animal e algal

Depois de 55 dias de cultivo integrado de camarão, tainha e macroalgas o desempenho do camarão não foi afetado pela presença da alga (Tabela 16). Os camarões cresceram em média 1,22 g $semana^{-1}$, tiveram uma sobrevivência de 90,6%, produtividade de 2,91 kg m^{-3} e um FCA de 1,84.

No presente estudo as tainhas em média cresceram 1,035 g $semana^{-1}$, tiveram 99,17% de sobrevivência, e uma produtividade de 4,08 kg m^{-3}. Mesmo sem detectar diferenças significativas nas análises estatísticas, os peixes cresceram 24,6% mais no tratamento com *Ulva* do que no tratamento controle e a produtividade dos peixes foi 4,6% maior no tratamento *Ulva* do que no tratamento controle, demonstrando uma tendência da *Ulva* como um potencial promotor de crescimento para peixes marinhos.

No final do experimento foram colhidos 317,01±32,02 g de macroalga por unidade experimental, porém se iniciou com 481,69 ± 0,36, sendo que a tendência da macroalga foi de perder massa durante o cultivo (Tabela 16).

Tabela 16. Desempenho animal e algal no sistema integrado de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias.

Parâmetro	**Controle**	***Ulva***	***p*-valor**
Camarão			
Peso médio final (g)	12,69 ± 0,61	13,04 ± 0,46	0,39
Sobrevivência (%)	91,25 ± 5,63	90,00 ± 2,19	0,71
Fator de conversão alimentar	1,86 ± 0,05	1,83 ± 0,02	0,19
Crescimento (g semana^{-1})	1,20 ± 0,06	1,24 ± 0,08	0,44
Biomassa final (kg)	2,31 ± 0,04	2,34 ± 0,00	0,15
Produtividade (kg m^{-3})	2,89 ± 0,05	2,93 ± 0,00	0,15
Tainha			
Peso médio final (g)	23,87 ± 2,71	25,45 ± 1,86	0,37
Sobrevivência (%)	100,00 ± 0,00	98,33 ± 3,33	0,36
Fator de conversão alimentar	1,33 ± 0,24	1,05 ± 0,21	0,12
Crescimento (g semana^{-1})	0,89 ± 0,16	1,18 ± 0,23	0,08
Biomassa final (kg)	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,50
Produtividade (kg m^{-3})	3,98 ± 0,45	4,17 ± 0,28	0,50
Macroalga			
Massa inicial	-	481,69 ± 0,36	-
Massa final (g EU^{-1})	-	317,01 ± 32,02	-
Total			
Biomassa final (kg)	2,67 ± 0,02 ^{b}	3,04 ± 0,02 ^{a}	<0,05
Produtividade (kg m^{-3})	2,81 ± 0,02 ^{b}	3,20 ± 0,03 ^{a}	<0,05

Valores apresentados como média ±desvio padrão. * Indica diferenças estatísticas pelo T-test (p<0,05).

2.3.3.3 Retenção de fósforo e nitrogênio

A porcentagem de nitrogênio na ração do camarão, ração dos peixes, os camarões, peixes e as macroalgas foi 6,09%, 7,07%, 2,88±0,21%, 2,62±0,13%, e 1,04±0,05 (macroalga no início) ou 2,94±0,30% (macroalga no final), respectivamente. A porcentagem de fósforo na ração de camarão, na ração dos peixes, nos camarões, nos peixes e nas macroalgas (no início e no final do experimento) foram 1,46; 2,26; 0,22±0,01%; 0,84±0,09%, e 0,08±0,01 (no início) ou 0,10±0,00 (no final), respectivamente. No presente estudo, foi observado que a retenção de nitrogênio e o fósforo do sistema foi 5,5% e 7,0¨% maior no tratamento *Ulva* do que o tratamento controle, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17. Retenção de fósforo e nitrogênio em um cultivo integrado de *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* e *Ulva fasciata* em sistema de bioflocos por 55 dias.

Parâmetro	Controle	*Ulva*	*p*-valor
Retenção de nitrogênio (%)	27,6 ± 0,8	29,2 ± 0,1*	0,005
Retenção de fósforo (%)	9,7 ± 0,3	10,5 ± 0,3*	0,019

Dados apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferenças estatísticas pelo T-teste (p<0,05).

2.3.3.4 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila na *Ulva fasciata*

Foi observado que o nitrogênio, fósforo, clorofila e os carotenoides foram maiores no final do cultivo de duas semanas (Tabela 18). Foi observado que os DPPH foram em média 0,001 mg L^{-1} e que não tiveram diferenças entre a amostra inicial e final. Também foi observado que os compostos fenólicos diminuíram aproximadamente 40% nas macroalgas que estavam no sistema multitrófico em bioflocos do que as macroalgas iniciais (Tabela 18).

Tabela 18. Concentração de nitrogênio, fósforo, clorofila, carotenoides e compostos fenólicos da macroalga *Ulva fasciata* no início e no final do cultivo integrado com camarão e tainha em sistema de bioflocos por 55 dias.

Composto	Inicial	Final	*p*-valor
Nitrogênio (%do peso seco)	1,04 ± 0,05	2,94 ± 0,30	<0,001
Fósforo (%do peso seco)	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00	<0,001
Clorofila (µg g^{-1} do peso fresco)	72,15±12,07	294,66±16,46	0,004
Carotenoides (µg g^{-1} do peso fresco)	4,99±0,73	16,46±3,41	0,022
Compostos fenólicos (µg g^{-1} do peso seco)	0,32±0,05	0,19±0,03	0,024

2.3.3.5 Produtividade de ulvana

A produtividade do extrato de ulvana foi 2,74% e 2,24% da *Ulva* inicial e final, respectivamente.

2.3.4 Discussão

2.3.4.1 Qualidade da água, sólidos e microbiologia

A eficiência da produção aquícola depende de manter os parâmetros de qualidade da água em condições adequadas para as unidades de cultivo (Boyd and Tuker, 2014). No presente trabalho todos os parâmetros de qualidade da água se mantiveram nos intervalos adequados para *L. vannamei* (Van-Wyk and Scarpa, 1999; Lin and Chen, 2001; Lin and Chen, 2003), *Mugil liza* (Boyd, 1982; Sampaio et al., 2002), e *Ulva fasciata* (Msuya and Neori, 2008).

A quantidade de lodos produzidos foi igual entre os tratamentos, mesmo com a maior biomassa de macroalga produzida. Portanto, a relação entre quilograma de lodos produzidos por quilograma de biomassa produzida, a relação lodos:biomassa, foi menor no tratamento *Ulva*, isso representa um ganho ecológico significante.

As bactérias totais depois do cultivo incrementaram em média, de 9,25 x 10^4 UFC ml^{-1} para 7,38 x 10^5 UFC ml^{-1}, provavelmente pelo incremento de entradas durante o

experimento (ração, peixe, macroalga), porém, a população de *Vibrio* sp diminuiu de 1,03 x 10^4 UFC mL^{-1}, em média para ambos tratamentos, do início do experimento, para 2,65 x 10^3 UFC mL^{-1} no final do experimento, mostrando que provavelmente as tainhas dentro do sistema possam melhorar o ambiente microbiano, já que a água do inóculo era de monocultivo de camarões. Nesse sentido, Sajali et al. (2019) observaram que os bioflocos e a água condicionada com tilápia podiam oferecer alguma proteção antagonista contra a doença AHPND (por suas siglas do inglês *acute hepatopancreatic necrosis disease*) causada por isolados de *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) que carregam um plasmídeo que codifica duas toxinas tipo Pir, uma doença que causou perdas econômicas devastadoras para a indústria do camarão. No entanto, essa condição ainda precisa ser testada com tainha no futuro.

2.3.4.2 Desempenho dos animais e das macroalgas

O desempenho do camarão foi similar aos resultados publicados por outros autores (Legarda et al., 2019; Poli et al., 2019a; Martins et al., 2020). No presente estudo as tainhas mostraram um bom crescimento e excelente sobrevivência do que os observados para *Mugil curema* integrados com *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos (Legarda et al., 2019). De modo geral, os peixes precisam crescer 400% ou mais para poder observar diferenças fisiológicas (NRC, 2011), assim se recomenda que no futuro o sistema integrado seja avaliado por mais tempo visando uma melhora no desempeno dos peixes. Os peixes no tratamento com *Ulva* cresceram 25% mais do que o tratamento controle sem algas o que indica que é possível que a presença da *Ulva* no sistema tenha potencial como promotor de crescimento para peixes marinhos, provavelmente devido aos polissacarídeos como ulvana como composto bioativo (Peso-Echarri et al., 2012).

O FCA foi em média 1,19, confirmando que as tainhas podem aproveitar os bioflocos como fonte de alimento como observado por Legarda et al. (2019). Os valores de FCA do presente estudo foram menores aos encontrados por Silva et al., (2013), que variaram entre 1,6 e 2,2; bem como os encontrados por Silva et al (2020) para *Mugil liza,* que variaram entre 1.3 - 5,3. No presente estudo os peixes tinham disponibilidade de alimento natural (bioflocos) as 24 horas do dia, e somente uma vez ao dia eram alimentados com dieta artificial, demonstrando que é possível melhorar o desempenho deste peixe em sistemas multitróficos em bioflocos.

No presente trabalho se observou que as macroalgas entraram no estágio reprodutivo o que se refletiu na diminuição da massa. Provavelmente as macroalgas tiveram algum fator de estresse porque o potencial de crescimento é maior do que observado no presente estudo. Dois fatores podem estar influenciando este resultado, sendo o primeiro a disponibilidade de amônia e o segundo o uso de algas provenientes do ambiente natural. Um dos fatores de estresse pode ser a fonte de nitrogênio disponível, já que as macroalgas tem preferência por amônia do que por outro composto nitrogenado (Graham et al., 2009). Já foi relatado que a macroalga *Ulva lactuca* cresce entre 7,6 a 16,8 % por dia, fertilizada com efluentes ricos em amônia (Neori, Cohen and Gordin, 1991; Ramus and Venable 2007). Nosso sistema de bioflocos estava maduro com bactérias nitrificantes que oxidam a amônia para nitrito e o nitrito para nitrato, deste modo a disponibilidade de amônia era limitada para ser consumida pelas macroalgas, refletindo na baixa absorção de nutrientes observada neste estudo. As macroalgas utilizadas no presente experimento foram coletadas no meio natural, se recomenda que sejam feitos futuros estudos que avaliem as macroalgas produzidas em laboratório, para verificar se apresentam esse mesmo comportamento ou se terão um melhor crescimento e absorção de nutrientes.

Foi observado que a biomassa e a produtividade final total do tratamento controle (Camarão + Tainha) foi similar ao que o reportado por Legarda et al., 2019, que avaliaram a integração de *Mugil curema* no cultivo de camarão em bioflocos. No final do experimento a biomassa dos peixes foi 16% da biomassa de camarão. Hoang et al. (2018) recomendaram 10% em policultivo de camarão e tainha, portanto podemos aumentar essa relação em sistema de bioflocos. Legarda et al., (dados não publicados – ver capítulo II da presente tese) observaram que para *Mugil cephalus* o limite de capacidade de carga era 3,7 kg m^{-3}, e neste trabalho se obteve uma maior produtividade com *Mugil liza* produzida em cativeiro.

2.3.4.3 Retenção de fósforo e nitrogênio

Em sistemas de cultivo intensivos é necessário oferecer altas quantidades de ração para suprir as exigências nutricionais dos animais, este alimento representa ao redor de 50-70% dos custos de produção (Rana e Hassan, 2009). O nitrogênio é o ingrediente mais caro nas dietas aquícolas e os resíduos de fósforo nos alimentos são a principal causa de eutrofização da água. Além disso, os animais de cultivo apresentam baixos níveis de fixação desses nutrientes (Crab et al., 2007; Avnimelech 2012). No presente estudo, observamos que as retenções de fósforo e o nitrogênio foram similares às reportadas para camarão e tainha em

sistema de bioflocos (Legarda et al., 2019). Além disso, observamos que a integração da macroalga no sistema melhorou a eficiência, devido principalmente ao teor de nitrogênio das algas e também a massa colhida. Essa retenção poderia ser incrementada se, por exemplo, utilizarmos macroalgas produzidas em laboratório ou se incrementamos a densidade algal, porém, essa hipótese precisa ser testada em estudos futuros.

Em base aos resultados do presente estudo, as macroalgas tiveram 182,7% mais nitrogênio na sua composição do que no início. Provavelmente os compostos inorgânicos da água do cultivo de camarões e das tainhas em sistema de bioflocos proporcionaram os nutrientes para aumento no teor proteico das algas. As macroalgas são capazes de captar a amônia ou nitrito, mas tem preferência pela amônia porque esta pode ser usada mais diretamente do que o nitrito na biossíntese de aminoácidos (Graham et al., 2009). Nosso sistema teve altas concentrações de nitrato, baixa de nitrito e amônia. As macroalgas provavelmente precisaram sintetizar a enzima nitrato reductase (NR) (Graham et al., 2009) para absorver os nutrientes do nosso sistema. A enzima NR tem cofatores que incluem o ferro e o molibdênio, as concentrações de ferro podem ser baixas na água de bioflocos, pois o ferro está ligado em compostos com baixa solubilidade, principalmente $Fe(OH_3)$ (Graham et al., 2009). Contudo, precisam ser feitos estudos que comprovem se a água do sistema de bioflocos tem teores baixos de ferro que possam impedir o crescimento de algas marinhas.

2.3.4.4 Compostos fenólicos, carotenoides e clorofila em *Ulva fasciata*

Os compostos antioxidantes das macroalgas estão captando o interesse principalmente pelas propriedades anti-inflamatórias dos polissacarídeos, esses polissacarídeos podem ser usados, por exemplo, como antibióticos naturais alternativos (Peso-Echarri et al., 2012). Nossos resultados mostraram que os compostos antioxidantes (clorofila e carotenoides) podem ser incrementados no sistema integrado em bioflocos. Provavelmente o estresse causado ao produzir a enzima NR para captar os compostos nitrogenados dissolvidos na água gera esse incremento nestes compostos (Graham, 2009).

Na bibliografia os valores de clorofila e carotenoides são diversos e se expressam em diferentes unidades. A clorofila-a reportada para macroalgas ulvaceas variaram entre 151,48 e 411,51 mg kg^{-1} (Raymundo et al., 2004), para *Ulva lactuca* entre 17.64 ± 1,65 e 28,16 ± 2,69 mg g^{-1} (El-Baky, El-Baz & El-Baroty, 2009). Os valores de carotenoides totais reportados na literatura para *Ulva,* variaram entre 72,27 e 129,04 mg kg^{-1} (Raymundo et al., 2004). Neste trabalho foram avaliados somente os betacarotenos, por isso os valores foram baixos quando

comparados como os valores de Raymundo et al. (2004). Comparando os resultados do presente trabalho com os reportes na literatura, observamos que os compostos antioxidantes dependem do ambiente, assim as macroalgas cultivadas no sistema integrado em bioflocos com camarão e tainha podem aumentar sua capacidade de retenção de nitrogênio assim como o teor de clorofila e carotenoides.

2.3.4.5 Produtividade da ulvana

A produção do polissacarídeo ulvana não foi afetada pelo sistema multitrófico em bioflocos, o que significa que o estresse nas algas causado pela baixa concentração de amônia (discutido acima) e a alta concentração de nitrato, diferente dos compostos fenólicos, não afetou a produtividade de ulvana na *Ulva fasciata*.

2.3.5 Conclusão

Em base aos resultados do presente trabalho a integração de *Ulva fasciata* no cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e tainha (*Mugil liza*) em sistema de bioflocos é possível, e essa integração melhora a retenção de fósforo e nitrogênio. Também *Ulva fasciata* no sistema AMTI-BFT tem maior teor de proteína, clorofila e carotenoides sem afetar a produtividade de ulvana.

2.3.6 Agradecimentos

Ao LAPMAR, principalmente ao Caio e o Filipe pelas tainhas. A PRESENCE pela doação da ração NUTRIPISCIS STARTER 45. A Norha e Priscila pelas análises microbiológicas. Ao Prof. Marcelo Maraschin, Eva Regina de Oliveira Rodrigues, Caroline Schmitz e Claudia do laboratório de Morfogênese e Bioquímica..

2.3.7 Fontes de financiamento

O presente trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, por meio da bolsa para a primeira autora do trabalho. O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Projeto Universal CNPq/425707/2018-0. Felipe Vieira Recebeu bolsa de produtividade pelo CNPq (número de processo PQ 305357/2017-4).

2.3.8 Referências

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, Water environment Federation (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC.

AOAC (2005) Official Methods of Analysis, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Avnimelech Y (2012) Biofloc technology – A Practical Guide Book. 2nd edn. The World Aquaculture Society, Baton Rouge. https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402

Boyd CE (1982) Water Quality Management for Pond Fish Culture. Elsevier, Amsterdam.

Boyd CE, Tucker CS (2014) Handbook for aquaculture water quality.Craftmaster Printers, Auburn.

Brito LO, Arantes R, Magnotti C, Derner R, Pchara F, Olivera A, Vinatea L (2014) Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linaeus) in intensive system. Aquaculture International 22:497-508. https://doi.org/10.1007/s10499-013-9659-0.

Chopin T., Buschmann A.H., Halling C., Troell M., Kautsky N., Neori A., Kraemer G.P., Zertuche-González J.A., Yarish C., Neefus C. (2001) Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. J. Phycol. 37:975–986. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x.

Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt T., Bossier P., Verstraete W. (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture 270:1-14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006.

Ebeling J.M., Timmons M.B., Bisogni J.J. (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257:346–358. https://doi.org/10.1016/ j.aquaculture.2006.03.019.

El-Baky, A.H.H., El-Baz, F.K. and El-Baroty, G.S. (2009), Natural preservative ingredient from marine alga Ulva lactuca L.. International Journal of Food Science & Technology, 44: 1688-1695. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.01926.x

FAO, 2018. State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome

FAO-FIGIS (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Fisheries Global Information System), 2019. Global Aquaculture Production 1950-2016. http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/es (accessed 14 September 2019).

Graham LE, Wilcox LW, Graham JM (2009) Algae. 2nd. ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.

Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (1983) Methods of Seawater Analysis, 2ed. Verlag Chemie, Weinheim.

Hoang MN, Nguyen PN, Le DVB, Nguyen DV, Bossier P (2018) Effects of stocking density of gray mullet *Mugil cephalus* on water quality, growth performance, nutrient conversion rate, and microbial community structure in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* integrated system. Aquaculture 496:123–133. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.018.

Legarda EC, Poli MA, Martins MA, Pereira SA, Martins ML, Machado C, Lorenzo MA, Vieira FN (2019) Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. Aquaculture 512:734308.

Lin YC, Chen JC (2001) Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 259:109-119. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1.

Lin YC, Chen JC (2003) Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224:193-201. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5.

Martins M.A., Poli M.A., Legarda E.C., Pinheiro I.C., Carneiro R.F.S., Pereira S.A., Martins M.L., Gonçalves P., Schleder D.D., Vieira F.N. (2020) Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. Aquaculture 514:734517. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734517.

McIntosh D., Samocha T.M., Jones E.R., Lawrence A.L., McKee D.A., Horowitz S., Horowitz A. (2000) The effect of a commercial bacterial supplement on the highdensity culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquac. Eng. 21:215–227. https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00030-8.

Msuya F, Neori A (2008) Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. Journal of Applied Phycology 20:1021-1031. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9300-6.

Neori, Cohen and Gordin, 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. Botanica Marina, 34, 483-489.

NRC (National Research Council) (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC.

Oliveira I.R., Soares L.S.H. (1996) Food Habits of the Mullet *Mugil platanus* Gunter, 1880 (Pisces: Mugilidae), From Cananeia, São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca 23:95–104

Otoshi C.A., Naguwa S.S., Falesch F.C., Moss S.M. (2007) Shrimp behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities. Glob. Aquacult. Advocate 2:67–69

Pallaoro M.F., Vieira F.N., Hayashi L. (2016) Ulva lactuca (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. Journal of Applied Phycology 28:3659-3665. https://doi.org/ 10.1007/s10811-016-0843-2.

Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Noseda MD, Smania A, Stadnik MJ (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Diseases and Protection 116:263-270. https://doi.org/10.1007/BF03356321.

Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C, González-Bermúdez CA, Ros-Berruezo GF, Martínez-Graciá C (2012) Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. Revista de biología marina y oceanografía 47:373-381. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001.

Poli M.A., Legarda E.C., Lorenzo M.A., Martins M.A., Vieira F.N (2019) Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. Aquaculture 498, 83-89.https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045.

Porra RJ, Thompson WA, Kreidemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. Biochim Biophys Acta 975, 384–394.

Ramus, J., Venable, M (2007). Temporal ammonium patchiness and growth rate in codium and ulva (ulvophyceae)1. Journal of Phycology, 23(4), 518–523.

Rana KJ, Hasan MR (2009) Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. Fisheries and Aquaculture Technical Paper No 541. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Ray A.J., Lewis B.L., Browdy C.L., Leffler J.W. (2010) Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture 299:89–98. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021.

Raymundo, MS, Horta, P, Fett, R. 2004. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). Rev. Bras. Cienc. Farm., 40, 4, 495-503 .

Ritchie R (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynth Res 89:27–41. https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9.

Sajali USBA, Atkinson NL, Desbois AP, Little DC, Murray FJ, Shinn AP (2019) Prophylactic properties of biofloc- or Nile tilapia-conditioned water against *Vibrio parahaemolyticus* infection of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 498:496-502. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.002.

Samocha T.M., Schveitzer R., Krummenaeur D., Morris T.C. (2012) Recent advances in super-intensive, zero-exchange shrimp raceway systems. Glob. Aquacult. Advocate 15(6):70–71.

Sampaio LA, Wasielesky W, Miranda-Filho KC (2002) Effect of Salinity on acute Toxicity of Ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 68:668-674. https://doi.org/10.1007/s001280306.

Silva, E.C. et al., 2020, Effect of feeding frequency on growth performance, blood metabolites, proximate composition and digestive enzymes of Lebranche mullet (*Mugil liza*) Juveniles. Aquaculture Research, pp. 1-8. https://doi.org/10.1111/are.14466

Schiavon M, Moro I, Pilon-Smits EA, Matozzo V, Malagoli M, Dalla Vecchia F (2012) Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. Aquat Toxicol 122-123:222-31. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.014.

Schveitzer R, Arantes R, Costódio PFS, Espírito Santo CM, Vinatea LA, Seiffert WQS, Andreatta ER (2013) Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering 56:59–70. https://doi.org/10.1016/ j.aquaeng.2013.04.006.

Strickland JDH, Parsons TR (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2ed. Fish. Res. Board Can., Ottawa.

Troell M., Halling C., Neori A., Chopin T., Buschmann A.H., Kautsky N., Yarish C. (2003) Integrated mariculture: asking the right questions. Aquaculture 226:69-90. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00469-1.

Van-Wyk P, Scarpa J (1999) Water quality management In: Van Wyk P, Davis-Hodgkins M, Laramore R, Main KL, Mountain J,

Scarpa J (eds) Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 141-161.

Van-Wyk P (1999) Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems In: Van Wyk P, Davis-Hodgkins M, Laramore R, Main KL, Mountain J,

Scarpa J (eds) Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 125-139.

2.4 CAPÍTULO IV: EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DE *ULVA* SP. NA DIETA PARA A *Seriola dorsalis* SOBRE O CRESCIMENTO E HEMATOLOGIA

O presente trabalho está formatado com as normas da revista Aquaculture, como tipo de artigo: *Short Communications*

Efeito da adição de diferentes níveis de *Ulva fasciata* na dieta para a *Seriola dorsalis* sobre o crescimento, hematologia e perfil de ácidos graxos no filé dos peixes

Esmeralda Chamorro Legarda[1], Maria Teresa Viana[2], Oscar Basilio Del Rio Zaragoza[2], Aurora Tinajero Chavez[2], Aketzali Amador, Krishna Flores, Arleta Kristina Skrzynska [3], André Luiz Braga[2], Marco Antonio de Lorenzo[1], Felipe do Nascimento Vieira[1]

[1] Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua dos Coroas 503, CEP 88061-600, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[2] Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, 22860 Ensenada, Baja California, México

[3] Departamento de Biología (Fisiología Animal) ,Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales Universidad de Cádiz, Polígono Río San Pedro s/n 11510 Puerto Real, Cádiz, España

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta de *Seriola dorsalis* sobre o crescimento, hematologia e perfil de ácido graxos no filé dos peixes. Os peixes foram alimentados por 48 dias com dietas contendo diferentes níveis de adição de *Ulva* 0%, 0,5%, 1% e 2%, cada dieta com três repetições. Os peixes foram mantidos em 12 tanques de 500 L, com sistema de aeração, aquecimento e sistema de recirculação de água. Foram povoados 10 peixes em cada tanque e alimentados com 5% da biomassa com sua respectiva dieta. O desempenho dos peixes foi avaliado por meio do crescimento, sobrevivência, fator de condição, assim como os índices hepatosomático e viscerosomático. Foram avaliados os índices hematológicos e de química sanguínea. O crescimento dos peixes foi semelhante entre os tratamentos, porém, foi observado que quanto maior a inclusão de *Ulva* na dieta era maior o comprimento e menor o fator de condição dos peixes. Observou-se que a adição de *Ulva* na dieta para *S. dorsalis* não afetou a contagem de células brancas ou vermelhas, porém, o hematócrito teve uma tendência a incrementar. A adição de *Ulva* incrementou em até 49% o teor de DHA no filé e diminuiu em aproximadamente 20% o ácido linoleico. Como resultado do presente trabalho se conclui que a *Ulva* pode ser adicionada nas dietas da *Sertiola dorsalis*, tendo efeitos sobre o incremento de comprimento e ao teor de DHA no filé, sem afetar a saúde dos peixes.

Palavras-chave: Olhete, *Ulva* sp., compostos bioativos, DHA.

2.4.1 Introdução

A *Seriola dorsalis* conhecida como olhete, California yellowtail, kingfish ou amberjack, entre outros, é um peixe muito apreciado no mercado pela qualidade do filé. Pode ser consumido fresco, congelado salgado ou seco (Instituto Nacional de Pesca do Governo do México, 2012). Segundo a FAO-FIGIS (2019), o cultivo deste peixe está em crescimento acelerado a partir de 2014, crescendo de uma tonelada em 2014, para 50 toneladas em 2017 e neste último ano movimentou 507 mil dólares.

O cultivo comercial no Japão antigamente começava com a captura de juvenis do meio natural, que se encontravam associados às macroalgas (Anraku, Azeta, 1965; Kolkovski, Sakakura, 2004). Atualmente o cultivo da *Seriola* já está estabelecido no Japão (Kolkovski, Sakakura, 2004), centro e norte América. Na fase larvária estes peixes crescem muito rápido quando comparados com outros peixes marinhos, consomem dietas ricas em ácidos graxos que são ofertadas por meio de rotíferos e artemia (Kolkovski, Sakakura, 2004). Porém, ainda existem dois fatores de mortalidade, o primeiro na primeira alimentação e o segundo causado pelo canibalismo (Sakakura, Tsucamoto, 1999). O canibalismo nesta espécie é observado mesmo em baixas densidades de estocagem e em indivíduos do mesmo tamanho (Kolkovski, Sakakura, 2004). Existem dietas comerciais para esta espécie, porém ainda existem alguns desafios a serem resolvidos; um deles é a susceptibilidade a parasitas, assim como deformidades causadas pela nutrição inadequada (Kolkovski, Sakakura, 2004).

Devido à qualidade do seu filé a demanda no mercado vem crescendo, deste modo existe um interesse em melhorar o cultivo comercial deste peixe. Pesquisas fisiológicas e nutricionais vêm sendo desenvolvidas com esta espécie (Rombenso et al 2016; Viana et al., 2019; Garcia-Organisra et al., 2019) a fim de desenvolver dietas sustentáveis que permitam o melhor desempenho do peixe. Mesmo que o cultivo desta espécie esteja estabelecido, é necessário melhorar técnicas que garantam um cultivo viável e ao mesmo tempo sustentável.

Os prebióticos são ingredientes não digestíveis que podem prover efeitos benéficos na microbiota intestinal, podendo também estimular o crescimento e a atividade de bactérias probióticas que podem melhorar a saúde e desempenho dos animais aquáticos (Gibson e Roberfroid, 1995; Song et al., 2014). A *Ulva* possui um polissacarídeo chamado ulvana, esse polissacarídeo tem potencial prebiótico, sendo responsável por melhorar a saúde dos organismos aquáticos e atuar como promotor de crescimento (Peso-Echarri et al., 2012) assim como compostos antioxidantes. A *Ulva* é produzida em escala comercial para alimentação humana, na indústria farmacêutica ou como fertilizante na agricultura (FAO, 2018). Também

estão sendo desenvolvidos estudos para produzi-la com o efluente do cultivo de camarão (Brito et al., 2014) ou em cultivos multitróficos integrados em bioflocos (Legarda et al., dados não publicados). O objetivo do uso de aditivos alimentícios é melhorar o desempenho dos animais de cultivo, alguns estudos demonstram que, mesmo não sendo significativa a diferença no crescimento com a aplicação de prebióticos, por exemplo, eles trazem benefícios à saúde dos animais de cultivo (Ringo et al., 2010; Song et al., 2014; Rodrigues et al., 2018).

Nos últimos anos as macroalgas têm ganhado a atenção, principalmente pela capacidade de absorver nutrientes que são potenciais poluentes em corpos de água, assim como a capacidade de absorver o carbono da atmosfera e contrariar o aquecimento global (Froehlich et al, 2019). Podem ser usadas como aditivos alimentícios em dietas aquícolas, para camarão, por exemplo, as algas pardas em pequenas quantidades 0.5% de *Sargassum* e 1% de ou 2% *Undaria* melhoram a resistência contra o vírus da mancha branca e modificam positivamente o microbioma em camarão-branco-do-pacífico (Schleder et al., 2019). *Undaria pinnitifida* pode melhorar a atividade da amilase e da lipase incluindo-a em apenas 4% da dieta, *Sargassum filipendula* pode melhorar a atividade da amilase, além disso, as duas macroalgas podem aumentar a superfície intestinal no camarão-branco-do-pacífico (Schleder et al., 2018). A macroalga *Sargasum filipendula* (0,5%) também ajudou a melhorar a resistência ao choque térmico em camarões atribuído principalmente a resistência ao perfil lipídico MALDI-TOF MS com fluidez da membrana, sinalização da morte celular e metabolismo lipídico, assim como ao perfil de proteínas MALDI-TOF MS com defesa antimicrobiana, regulação do DNA e metabolismo energético (Schleder et al., 2017). Em peixes existem poucos estudos, Nakagawa (1997) descreve que as macroalgas aceleram a assimilação do ácido ascórbico nos peixes e melhoram as condições fisiológicas relacionadas à nutrição da vitamina C, consequentemente, o metabolismo lipídico, especialmente a lipólise. O mesmo autor disse que os efeitos das macroalgas na melhoria do metabolismo lipídico podem ser parcialmente explicados pelo efeito sinérgico da vitamina C. Valente et al. (2016) observaram que a inclusão da *Ulva* nas dietas de tilápia-do-nilo podia melhorar a resposta imunológica inata nos peixes. Wassef et al. (2013) viram que é possível melhorar o desempenho do peixe marinho *Dicentrarchus labrax*, a composição dos nutrientes e resistência ao estresse, adicionando 5% de farinha de *Ulva lactuca* e *Pterocladia* nas dietas para este peixe.

Por outra parte, nos últimos anos aumentaram os estudos encaminhados a incrementar os ácidos graxos nos organismos aquícolas cultivados, a utilização de microalgas tem sido um candidato promissor (Guimaraes et al., 2019), assim como a utilização de 0,8%

de *Ulva* em dietas para reprodutores de camarão-branco-do-pacífico demonstrou aumentar os níveis de ácidos graxos como ARA e DHA nas gónadas de fêmeas maduras (Corral-Rosales et al., 2019).

Contudo, ainda se desconhece o efeito da adição da adição de *Ulva* na dieta de *Seriola dorsalis*. Deste modo o presente trabalho avaliou o efeito da adição de diferentes níveis de *Ulva fasciata* na dieta da *Seriola dorsalis* sobre o crescimento, saúde animal e qualidade do filé.

2.4.2 Material e métodos

2.4.2.1 Material biológico

Foram utilizados 120 juvenis de *Seriola dorsalis* doados pela empresa Ocean Baja Labs Baja Seas, S. A. (Ejido Eréndira, Baja California).

2.4.2.2 Localização

O experimento foi realizado no Laboratorio de Nutrición y Fisiologia do Instituto de Investigaciones Oceanologicas (IIO) da Universidad Autónoma de Baja Califórnia (UABC), em Ensenada, México.

2.4.2.3 Macroalga

A macroalga (*Ulva fasciata*) incluída nas dietas para *Seriola dorsalis* foram produzidas em um sistema multitrófico integrado com camarão e tainha em sistema superintensivo de bioflocos. As macroalgas foram congeladas e liofilizadas, essas macroalgas possuíam 2,94 mg L^{-1} de nitrogênio total, 0,10 mg L^{-1} de fósforo total, 294,66±16,46 µg g^{-1} de peso fresco de clorofila, 16,46±3,41 µg g^{-1} do peso fresco de carotenoides e 0,19 µg g^{-1} do peso seco de compostos fenólicos (Legarda, dados não publicados – ver capítulo III da presente tese), sendo que estas macroalgas possuíam maiores concentrações do que as macroalgas coletadas no meio natural. As macroalgas possuíam 20,8% de proteína, 32,4% de cinzas e 6% de lipídeos.

2.4.2.4 Dietas experimentais

Foi adicionada *Ulva fasciata* liofilizada produzida em sistema multitrófico integrado com camarão e tainha em bioflocos à dieta da *Seriola dorsalis* em 0, 0.5, 1 e 2%. Foram formuladas quatro dietas isoproteicas (450 g de proteína bruta kg^{-1} de dieta) e isolipídicas (125 g de lipídeos kg^{-1} de dieta), os ingredientes utilizados e a composição proximal se apresentam na Tabela 19 e a composição de ácidos graxos se encontra na Tabela 20. As dietas experimentais foram preparadas no Instituto de Investigaciones Oceanologicas (UABC, Ensenada, México) de acordo com protocolos internos. Os ingredientes foram moídos em 0,8 mm (Pulvex 2000, México), peneirados (Kemutek-Gardner K300, USA) e homogeneizados utilizando um misturador (Robot Coupe, EUA). Os microingredientes (lisina, taurina, metionina, stay C, benzoato de sódio, BHT, cloreto de colina, nature DHA, premix de vitaminas e minerais e a *Ulva*) foram misturados por 1 minuto (Robot Coupe R-60, USA), seguidamente foram incorporados os macronutrientes (farinha de pescado, farinha de ave, farinha branca de trigo, glúten de milho) e misturados por 1,2 minutos. Posteriormente se adicionaram os ingredientes líquidos na sua ordem: o amido diluído em relação 1:1 de água e finalmente a gelatina diluída em relação 2:1 de água (o total de água utilizada foi 40% do peso total final), óleo de peixe e sebo, se misturou cada vez que se adicionava um ingrediente 1,2 minutos. Depois disso, a mescla foi imediatamente peletizada com moedor de alimentos comercial e seca a 50°C até que a umidade fosse menor de 90% (entre 24 – 48 horas).

Tabela 19. Ingredientes da formulação (g kg^{-1}) e composição proximal das dietas usadas para alimentar juvenis de *S. dorsalis* contendo diferentes níveis de *Ulva* sp. Os valores estão apresentados em g kg^{-1} em base a material seca.

	0%	0.5%	1%	2%
Ingrediente				
Farinha de peixe [a]	200	200	200	200
Farinha de ave [b]	350	350	350	350
Farinha branca de trigo [c]	62	57	52	42
Gelatina [d]	60	60	60	60
Gluten de milho [e]	20	20	20	20
Sebo [f]	20	20	20	20
Amido [g]	200	200	200	200
Lisina	10	10	10	10
Taurina	10	10	10	10
Rovimix para peixes carnívoros [h]	20	20	20	20
Stay-C [h]	1	1	1	1
Nature-DHA [i]	20	20	20	20
Óleo de peixe	20	20	20	20
Benzoato de sódio	2	2	2	2
Cloreto de colina				
BHT	0.1	0.1	0.1	0.1
Metionina	4	4	4	4
Ulva [j]	0	5	10	20
Composição proximal g kg^{-1}, em base da matéria seca				
Proteína	455	448	445	443
Lipídeos	120	126	129	131
Cinzas	61	63	62	60
ELN*	330	330	330	328

[a] Grau alimentício pet da farinha de peixe 65% proteína. Proteinas Marinas y agropecuárias S. A. de C. V.

[b] Grau alimentício pet da farinha de ave 68% proteína, Scoular de México S. de R.L. de C.V.

[c] Molinera del Valle S. A. De C. V.

[g] Progel Mexicana S.A. de C.V., México.

[e] Ingredion México S.A. de C.V., México.

[f] Industrial de Grasas y Derivados Tijuana, Baja Califórnia, México.

[h] Rovimix; Stay-C DSM, Guadalajara, México.

[i] ADM, México contém 240 y 70- g kg-1 DHA e EPA.

[g] Scoular de México, S. de R.L. de C.V.

[j] *Ulva* liofilizada produzida no sistema IMTA em BFT (Camarão + Tainha + *Ulva*)

*Extrato livre de nitrogênio ELN (%)=100−(% proteína bruta + % lipídeos + % cinzas).

Tabela 20. Perfil dos principais ácidos graxos e dietas com diferentes níveis de inclusão de farinha de *Ulva fasciata* para o peixe olhete (*Seriola dorsalis*).

Ácido graxo	**0% *Ulva***	**0,5% *Ulva***	**1% *Ulva***	**2% *Ulva***
14:0	4,07	4,20	2,35	2,71
16:0	19,03	17,92	16,67	16,54
18:0	7,41	7,42	6,16	7,47
16:1	3,55	3,40	3,07	3,05
18:1n-9	19,92	18,29	16,23	15,18
18:1n-7	1,58	1,51	1,15	1,02
20:1n-9	0,42	0,41	0,39	0,36
18:2n-6	9,29	9,30	7,40	6,90
20:2	0,26	0,22	0,27	0,17
18:3n-6	0,86	0,81	0,64	0,49
18:3n-3	0,22	0,20	0,20	0,24
20:4n-6	1,09	1,03	0,83	0,61
20:5n-3	1,75	1,63	1,40	1,10
22:6n-3	3,58	3,74	3,23	3,05
Σ Saturados	30,51	29,54	25,18	26,72
ΣMUFA	25,47	23,61	20,84	19,61
ΣPUFA	7,50	7,41	6,30	5,49
LC-PUFA n-3	5,55	5,57	4,83	4,39
LC-PUFA n-6	11,24	11,14	8,87	8,00
n-3/n-6	0,49	0,50	0,54	0,55
DHA:EPA	2,05	2,29	2,31	2,77
Outros	26,97	29,92	40,01	41,11

Valores apresentados em mg g^{-1} do total de lipídeos. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=3.

2.4.2.5 Desenho experimental

Foram comparados quatro tratamentos equivalentes as porcentagens de adição da *Ulva fasciata* nas dietas: 0%, 0,5%, 1% e 2%. Cada grupo experimental possuía três repetições distribuídas aleatoriamente.

2.4.2.6 Manejo e alimentação

Foram povoados 10 peixes com peso médio inicial 7,93 ± 0,24 g e comprimento médio inicial 8,21 ± 0,08 cm em cada um dos 12 tanques de 500 L. A água dos tanques permanecia em recirculação constante, passava por um filtro biológico (com beats grau alimentício como substratos), por um fraccionador de espuma (*skimmer*) e luz ultravioleta. Cada tanque possuía um decantador que era limpo a cada dois dias. Duas vezes por semana era feita a retro lavagem do sistema de recirculação fechando a entrada de água aos tanques de cultivo e ligando um soprador de ar para limpar os substratos (beats). O sistema de recirculação possuía um reservatório de água que continha um aquecedor com termostato, para manter a temperatura em 20°C. Cada tanque possuía uma pedra porosa ligada a um

sistema de aeração para manter o oxigênio dissolvido acima de 5 mg L^{-1}. Diariamente era mensurada a temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade utilizando uma sonda multiparâmetro YSI-55 (YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA). Duas vezes por semana se verificou a amônia e o nitrito utilizando os kits API test (Mars Fishcare Inc., Chalfont, PA, USA) e o pH foi mensurado semanalmente com pHmetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Os peixes foram alimentados durante 48 dias, três vezes ao dia (8:00; 12:00 e 17:00h) com relação de 5% da biomassa, a quantidade de ração foi ajustada na metade do experimento, quando foi realizada uma biometria parcial.

2.4.2.7 Parâmetros zootécnicos

Depois de 48 dias alimentando os peixes com as dietas elaboradas, todos os peixes foram contados, pesados e medidos individualmente. Durante o experimento foi pesada a quantidade de alimento oferecida por tanque. Posteriormente foi calculado o peso médio, o comprimento médio, o fator de conversão alimentar, FCA= (ração total consumida/incremento de peso), fator de condição FC= (peso final/comprimento^3) x 100, sobrevivência (%) = (número de animais no final / número de animais no início) x 100.

2.4.2.8 Coletas

Dois peixes por unidade experimental foram eutanasiados de acordo com o protocolo da UABC com solução 2-phenoxyl-ethanol (100 ppm), imediatamente foram coletadas amostras de sangue com seringas de 3 mL e o sangue foi dividido em dois tubos, um tubo com K2EDTA (BD Microtainer®; Franklin Lakes, NJ, USA) para as análises hematológicas e outro tubo, sem anticoagulante, que foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. Todas as amostras de soro foram armazenadas a -20°C. Seguido disso, cada peixe foi dissecado para calcular os seguintes parâmetros morfometricos: índice hepatosomático (IHs) = (peso do fígado/peso do peixe inteiro) x 100; índice víscerosomático (IVS) = (peso das vísceras/peso do peixe inteiro) x 100.

Foram coletadas amostras de fígado e cérebro e colocadas em RNA later (Ambion) por 24 h, e despois congeladas a -80°C para posteriores análises. Foram coletados filés dos peixes e congelados a -80°C para análises bromatológicas.

2.4.2.9 Parâmetros hematológicos dos peixes

Da amostra de sangue tomada foi medido o hematócrito em tubo capilar com 2/3 de heparinização (LEEX Equipment, Mexico). Os tubos foram selados e centrifugados por 10 minutos a 7000 rpm (centrifuga micro-hematócrito, Premiere® XC-3012, México), a leitura foi medida utilizando um leitor de hematócrito e expressa em porcentagem (Del Rio-Zaragoza et al., 2008). Foram contados todos os glóbulos vermelhos, (eritrócitos), glóbulos brancos e trombóticos utilizando o método de Natt e Herricks (1952), para isso as amostras de sangue foram diluídas 200 vezes, colocadas em câmara de Neubauer (Marienfels-SuperRior, Lauda-Königshofen, Alemanha), seguidamente foram contadas usando um microscópio ótico (Karl Zeiss, Primo Star, México). O volume corpuscular médio (VCM) foi calculado utilizando formulas standard (Rio-Zaragoza et al., 2008).

2.4.2.10 Análises bromatológicas das dietas e do músculo dos peixes

Foram realizadas as análises de umidade, cinzas, proteína (Kjeldal, VELP macro) e lipídeos (método Soxlet) para todas as dietas e para os músculos. Adicionalmente foi analisado o conteúdo de ácidos graxos dos músculos dos peixes (método de Folch et al. (1957)) e cromatografia de gases, Agilent Technologies 6850, Network GC system) e integradas com o programa Enhanced Data Analysis, Auto integration, se integraram somente os picos com maior proporção. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.4.2.11 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a testes de Bartlet e Levene para comprovar os pré-requisitos de homogeneidade de variâncias e normalidade, respectivamente. Foi feita regressão linear para os valores de desempenho e índices somáticos e avaliada a significância dos coeficientes da regressão. Os dados hematológicos foram comparados com ANOVA unifatorial seguida do teste de separação de médias de Tukey. Todos os testes com significância de 0,05. Os valores de porcentagem foram transformados por meio de arcoseno da raiz (Zar, 2010).

2.4.3 Resultados

2.4.3.1 Desempenho zootécnico e índices somáticos dos peixes

O peso e comprimento inicial foram estatisticamente iguais para todos os níveis de adição de *Ulva* (Tabela 21). No final do experimento o comprimento final teve uma tendência a incrementar com a adição de *Ulva* na dieta, que foi refletido também no fator de condição o qual teve uma tendência a diminuir quanto maior era a adição de *Ulva* na dieta (Tabela 21). O ganho de peso, o fator de conversão alimentar, a produtividade, a sobrevivência, o índice hepatossomático e gonadossomático não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 21. Desempenho zootécnico da *Seriola dorsalis* alimentada por 48 dias com dietas com adição de diferentes níveis de *Ulva* sp.

	0% *ulva*	**0,5% *ulva***	**1% *ulva***	**2% *ulva***	***p*-valor ANOVA**	***p*-valor regressão**
Peso inicial (g)	7,78±0,15	8,22±0,20	7,82±0,15	7,90±0,22	0,694	-
Comprimento inicial (cm)	8,19±0,08	8,24±0,05	8,20±0,17	8,22±0,09	0,959	-
Peso final (g)	43,56±0,35	44,38±0,96	44,82±3,46	46,36±1,65	0,367	0,076
Comprimento final (cm)	13,90±0,10	14,02±0,03	14,37±0,59	14,42±0,16	0,218	0,038 $r^2 = 0,3627$ y= 13,94 + 0,274*x
Ganho de peso (%)	460±10	440±4	473±34	487±14	0,398	0,055
FCA	1,30±0,07	1,52±0,34	1,26±0,06	1,31±1,19	0,696	0,697
Produtividade (kg m^{-3})	0,84±0,04	0,77±0,12	0,86±0,04	0,83±0,09	0,778	0,778
Sobrevivência (%)	96,67±5,77	95,00±7,07	96,67±7,07	90±14,14	0,742	0,742
FC	1,62±0,03	1,61±0,04	1,51±0,07	1,53±0,03	0,034	0,034
IHS	1,04±0,08	1,10±0,08	1,09±0,05	1,06±0,02	0,928	0,928
IVS	8,46±0,25	8,14±0,42	8,86±0,17	8,84±0,34	0,084	0,084

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.

2.4.3.2 Hematologia e química sanguínea

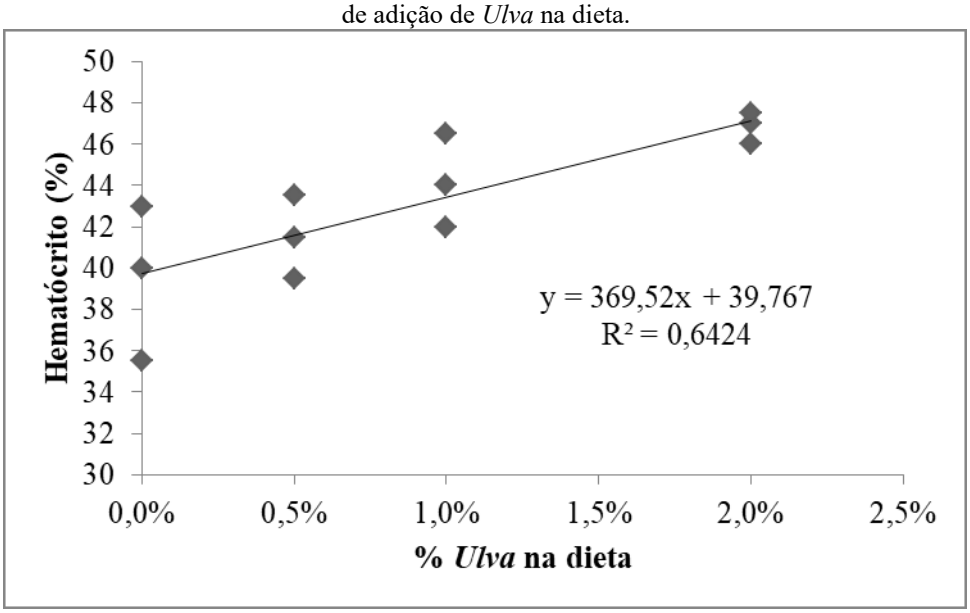
A contagem de células vermelhas, células brancas, assim como o volume corpuscular médio foram estatisticamente iguais para todos os tratamentos (Tabela 22). O hematócrito teve uma tendência a aumentar quando se incrementou a adição de *Ulva* (Tabela 22, Figura 7).

Tabela 22. Parâmetros hematológicos e da química sanguínea de juvenis de olhete (*Seriola dorsalis*) alimentada por 48 dias com dietas com adição de diferentes níveis de *Ulva* sp.

	0% *Ulva*	**0,5% *Ulva***	**1% *Ulva***	**2% *Ulva***	***p*-valor ANOVA**	***p*-valor regressão**
Hematócrito (%)	39,50±3,77	41,50±2,00	44,17±2,25	46,83±0,76	0,034	0,002 y = 369,52x + 39,767 R^2 = 0,6424
Eritrócitos ($x10^6$ cel mm^3)	2,87±0,13	3,00±0,37	3,05±0,18	3,19±0,34	0,316	0,141
Leucócitos ($x10^4$ cel mm^3)	1,56±0,12	1,52±0,23	1,77±0,48	1,42±0,15	0,424	0,649
VCM (fL)	137,92±8,06	139,52±12,07	146,07±13,98	150,59±17,32	0,550	0,1810

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. VCM: Volume Corpuscular Médio.

Figura 7. Hematócrito do olhete alimentodos por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta.



2.4.3.3 Bromatologia do músculo

Os músculos de *Seriola dorsalis* apresentaram um teor de proteína em média de 83,02±1,97%, lipídeos de 13,02±1,50%, umidade 75,53±0,67% e cinzas de 23,16±1,01%. Os ácidos graxos 14:0 (mirístico), C18:1n-9 (oleico), 20:1 (eicosadienoico) e 18:2n-6 (linoleico) tiveram uma tendência a diminuir, conforme aumentava a adição da *Ulva* na dieta, consequentemente os MUFA diminuíram. O ácido graxo C22:6n-3 (docosaexaenoico DHA) teve uma tendência a incrementar quanto maior a adição de *Ulva* na dieta, consequentemente os PUFA tiveram o mesmo comportamento (Tabela 23). A relação n-3/n-6 no músculo do olhe-te teve uma tendência a aumentar com conforme se adicionava mais *Ulva* na dieta (Figura 8), devido os n-6 serem iguais para todos os níveis de *Ulva* e os n-3 aumentarem de

18,22±0,30 mg g^{-1} no tratamento sem adição de *Ulva* (0%), para 26,55±1,46 mg g^{-1} lipídeos no tratamento com 2% de adição de *Ulva* na dieta (Tabela 23).

Figura 8. Regressão linear da relação n-3/n-6 dos ácidos graxos do filé dorsal dos peixes alimentados por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta.

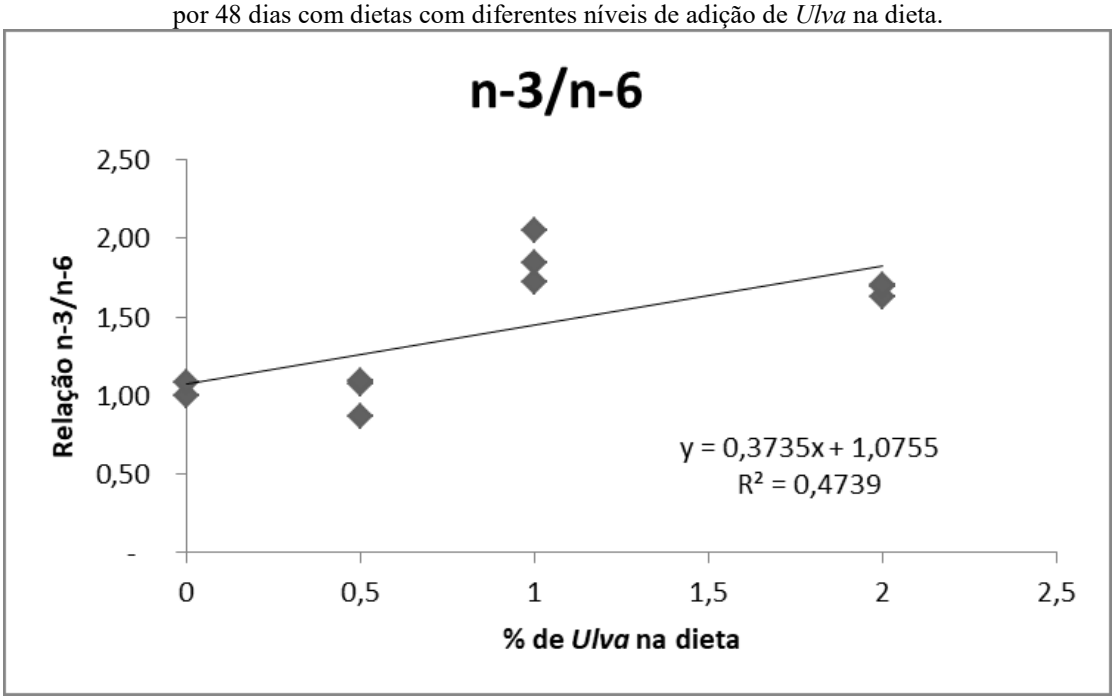


Tabela 23. Perfil dos principais ácidos graxos do músculo do peixe (*Seriola dorsalis*) alimentados por 48 dias com dietas com diferentes níveis de adição de *Ulva* na dieta.

Ácido graxo - mg g^{-1}	**0% *Ulva***	**0,5% *Ulva***	**1% *Ulva***	**2% *Ulva***	**ANOVA**	**Regressão linear**		
						Equação	R^2	*p*-valor
14:0	3,01±0,15^{ab}	3,3±0,51^{a}	2,31±0,23^{b}	2,31±0,32^{b}	0,024	y = -0,4711x + 3,1578	0,414	0,032
16:0	17,03±0,27	16,64±0,09	17,61±0,94	16,42±0,32	0,180	-	-	0,455
18:0	5,88±0,15^{b}	5,88±0,32^{b}	6,53±0,28^{ab}	6,55±0,19^{a}	0,031	y = 0,4054x + 6,0827	0,565	0,012
16:1	4,23±0,28^{ab}	4,29±0,63^{b}	2,74±0,20^{ab}	2,72±0,25^{a}	0,034	-	-	0,094
18:1n-9	25,03±0,15^{a}	26,31±0,72^{a}	17,09±1,68^{b}	16,50±1,31^{b}	<0,001	y = -4,8169x + 25,082	0,611	0,005
18:1n-7	2,20±0,03	2,33±0,07	2,32±0,05	2,16±0,14	0,144	-	-	0,283
20:1n-9	0,43±0,07^{ab}	0,49±0,04^{a}	0,34±0,05^{b}	0,30±0,04^{b}	0,006	y = -0,0839x + 0,4674	0,5295	0,011
18:2n-6	14,31±0,66^{a}	14,15±0,08^{a}	11,48±0,49^{b}	11,97±0,34^{b}	<0,001	y = -1,307x + 14,106	0,5327	0,011
20:2	0,29±0,01	0,31±0,01	0,37±0,06	0,29±0,04	0,177	-	-	0,844
18:3n-6	0,77±0,00^{ab}	0,86±0,08^{b}	0,61±0,07^{a}	0,64±0,06^{a}	0,019	-	-	0,067
18:3n-3	0,23±0,00	0,29±0,07	0,33±0,07	0,21±0,04	0,184	-	-	0,309
20:4n-6	2,81±0,77	2,90±0,58	3,08±0,73	3,26±0,96	0,924	-	-	0,462
20:5n-3	2,83±1,27	2,09±088	3,22±1,08	3,53±0,87	0,387	-	-	0,196
22:6n-3	15,27±0,81^{b}	14,66±2,20^{b}	24,82±2,60^{a}	22,81±2,29^{a}	0,002	y = 4,5009x + 15,467	0,4509	0,024
Σ Saturados	26,26±0,27	25,82±0,29	24,28±2,78	25,29±0,54	0,383	-	-	0,515
ΣMUFA	31,89±0,16^{a}	31,95±2,39^{a}	21,66±1,42^{b}	21,68±1,64^{b}	<0,001	y = -5,8492x + 31,911	0,6368	0,003
ΣPUFA	21,42±1,02^{a}	19,82±2,57^{a}	32,07±3,48^{b}	30,45±2,42^{b}	0,002	y = 5,2762x + 21,573	0,4786	0,019
LC-PUFA n-3	18,22±0,30^{a}	17,03±1,72^{a}	28,37±3,11^{b}	26,55±1,46^{b}	<0,001	y = 4,9359x + 18,307	0,4664	0,021
LC-PUFA n-6	17,50±0,65	16,94±1,67	15,18±1,23	15,88±1,27	0,067	-	-	0,093
n-3/n-6	1,04±0,06^{a}	1,01±0,13^{a}	1,87±0,17^{b}	1,67±0,04^{b}	<0,001	y = 0,3743x + 1,0685	0,4577	0,022
DHA:EPA	6,08±3,01	7,94±3,35	8,28±2,93	6,90±2,73	0,853	-	-	0,958
Outros	4,69±0,27	7,08±2,12	6,06±2,47	9,43±5,14	0,456	-	-	0,135

Valores apresentados em mg g^{-1} do total de lipídeos. Dados apresentados como média ± desvio padrão, n=3.

2.4.4Discussão

Nos cultivos comerciais pequenas melhoras no ganho de peso podem resultar em ganhos significativos, desta maneira se recomenda fazer testes avaliando se a adição da *Ulva* na dieta pode tornar o cultivo do olhete mais produtivo em termos econômicos. Mesmo não tendo diferenças significativas, o peso final teve uma tendência a incrementar quando se incrementou a adição da *Ulva*, foi 6% maior no tratamento com 2% de adição de *Ulva* do que o que não tinha adição.

O índice de condição relaciona o peso e comprimento dos peixes e aporta informação sobre o estado nutricional e estratégias de crescimento (Froese, 2006), para a maioria das espécies de peixes o crescimento é isométrico (Froese, 2006) sendo que quanto maior o comprimento na maioria dos peixes é indicativo de melhor condição. No presente trabalho observou-se que quanto maior era a adição de *Ulva* na dieta, os peixes tinham um comprimento maior e um fator de condição menor, demonstrado que os peixes tinham melhor condição do que os que não tinham adição de *Ulva* na dieta. Os valores de IC reportados neste trabalho foram maiores aos encontrados em *Seriola dorsalis* alimentados com substituição de farinha de peixe por farinha de soja nas dietas (Viana et al., 2019) e também menores aos encontrados por Wegner et al. (2018) em peixes de aquicultura e de captura. O presente trabalho é o primeiro reporte de adição de ulva na dieta para *Seriola dorsalis* como promotor de crescimento, mesmo tendo 6% mais peso médio final o tratamento com 2% de adição de *Ulva* comparado com o controle sem adição, não se observou diferença significativa, provavelmente seja necessário maior tempo de avaliação para observar essa diferença ou maior número de réplicas.

No presente estudo se observou que a adição de *Ulva* não afeta a contagem de células vermelhas e brancas, nem o volume corpuscular médio dos peixes, já o hematócrito incrementou com o aumento da adição da macroalga na dieta, contudo os valores estavam dentro dos valores considerados normais para esta espécie (Viana et al., 2019), esse aumento pode indicar que existe um limite na adição de *Ulva* nas dietas que pode causar desidratação e que não foi atingido no presente trabalho. Seria necessário realizar novas pesquisas com maiores porcentagens de adição de *Ulva* na dieta para esta espécie para conhecer se existe limite de adição de *Ulva* na dieta, considerando o hematócrito como parâmetro.

Por outro lado, a composição de proteína, lipídeos e cinzas esteve de acordo à reportada para o filé do peixe olhete na literatura (Saito, 2012). Os lipídeos encontrados para o

filé neste trabalho (~13%) foram maiores aos encontrados por outros autores com peixes graxos (Saito, 2012; Canepa et al., 2016).

Os juvenis do olhete não são capazes de produzir alguns ácidos graxos e precisam que sejam administrados na dieta, como os ácidos graxos n-3 e n-6 LC-PUFAs, principalmente o DHA (Rombenso et al., 2016). A principal fonte destes ácidos graxos é o óleo de peixe e muitos estudos estão sendo encaminhados para utilizar óleos que substituam essa fonte, como o óleo de soja (Rombenso et al., 2016), óleo de canola ou óleo de aves (Rombenso et al., 2016). Os mesmos autores sugerem que o DHA e o ARA são os principais impulsionadores do LC-PUFA nos juvenis de olhete. Os resultados do presente trabalho sugerem que quanto maior foi a adição de farinha de *Ulva fasciata* na dieta, maior foi o DHA no filé, mesmo a *Ulva* tendo na sua composição DHA (Ortiz et al., 2006; McCauley et al., 2016) as porcentagens de inclusão de *Ulva* nas dietas foi muito baixa para ter acrescentado o DHA no filé do peixe. Os carotenos de modo geral são lipossolúveis . Provavelmente existe um efeito sinérgico entre os antioxidantes presentes na alga e a síntese lipidica, como observado por Nakagawa (1997) com o acido ascórbico.

Os ácidos graxos MUFA conforme maior a inclusão da *Ulva* na dieta diminuíram, provavelmente está relacionado com o consumo energético (Nakagawa, 1997), pois esses ácidos graxos são mais utilizados metabolicamente pelos peixes (NRC, 2011). No presente trabalho os peixes com mais adição de *Ulva* na dieta cresceram mais, portanto precisavam de mais gasto energético do que os peixes sem *Ulva*. O 18:3n-6 é encontrado em peixes produzidos em aquicultura (Saito, 2012) já que provém de dietas artificiais, é um ácido graxo é pouco desejado pelo consumidor. Neste trabalho observamos que a adição de *Ulva* ajuda a diminuir esse ácido graxo, melhorando assim a qualidade do filé.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, observamos uma tendência a aumentar os PUFA no filé da *S. dorsalis* quanto maior a adição da *Ulva* na dieta o que significa que provavelmente a presença desta macroalga nas dietas pode ajudar no metabolismo lipídico de ácidos graxos de cadeia longa, o que pode estar relacionado com o efeito sinérgico com antioxidantes como, por exemplo, o efeito da sinergia da vitamina C com o metabolismo lipídico relatado por Nakagawa (1997). Ainda são necessários estudos metabólicos e moleculares para desvendar esse aspecto.

2.4.5 Conclusão

Como resultado do presente trabalho se conclui que a *Ulva* pode ser adicionada nas dietas de *Seriola dorsalis*, tendo efeitos sobre o incremento de comprimento e teor de DHA no filé (49% de incremento) a partir de 1% de adição na dieta, sem afetar os parâmetros hematológicos dos peixes.

2.4.6 Financiamento

A primeira autora recebeu bolsa da CAPES durante os primeiro mês de estância no México e os últimos quatro meses pelo CNPq por meio do programa de doutorado sanduíche no exterior. Os recursos para execução do experimento e as análises fizeram parte do projeto Conacyt PN-2016-2293 da Dra. Maria Teresa Viana. O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Projeto Universal CNPq/425707/2018-0. Felipe do Nascimento Vieira Recebeu bolsa de produtividade pelo CNPq (número de processo PQ 305357/2017-4).

2.4.7 Agradecimentos

Ao Laboratório de Nutrición y Fisiologia Animal do Instituto de Investigaciones Oceanológicas da Universidad Autónoma de Baja Califórnia. Agradeço a Jose Mata pela ajuda na coleta.

2.4.8 Referencias

Anraku, M., Azeta, M., 1965. The feeding habits of larvae and juveniles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel associated with floating seageeds. Bulletim of the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory 33, pp. 14-15.

Brito, L. O., Arantes, R., Magnotti, C., Derner, R., Pchara, F., Olivera, A., Vinatea, L.,2014. Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linaeus) in intensive system. Aquaculture International, 22, 497-508.

Canepa, M.M., et al, 2016. Nutritional parameters of dorsal and ventral fillets in summer and winter from farmed yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). Aquaculture Research, 47, pp. 1560–1568. doi:10.1111/are.12617

Corral-Rosales, D.C. et al., 2019. Fatty acids, sterols, phenolic compounds, and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei*

broodstock. Journal of Applied Phycology, 31, 6, pp 4009–4020. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01829-2

Del Río-Zaragoza, O.B., Hernández-Rodríguez, M., Bückle-Ramirez, L.F., 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. Mar. Freshw. Behave. Phy. 41, 135–145.

FAO, 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma.

FAO-FIGIS. Global Aquaculture Production 1950-2017. Data da pesquisa: 03 de dezembro de 2019. [http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds= Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY].

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 276, 497–507.

Froehlich, H. E., Afflerbach, J. C., Frazier, M., Halpern, B. S., 2019. Blue Growth Potential to Mitigate Climate Change through Seaweed Offsetting. Current Biology.

Froese, R., 2006. Cube law, condition factor, and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. Journal of Applied Ichthyology, 22 (4), pp. 241-253. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x.

Garcia-Organista, A.A., 2019. The effects of high dietary methionine and taurine are not equal in terms of growth and lipid metabolism of juvenile California Yellowtail (*Seriola dorsalis*), Aquaculture 512. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734304

Guimarães A.M, et al., 2019. *Aurantiochytrium* sp. meal can replace fish oil in practical diets for the juvenile Pacific white shrimp. Aquaculture Nutrition, 25, pp. 798–807.

Instituto Nacional de Pesca do Governo de México. Jurel. Diário oficial, junio de 2012. Disponível em: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308116/03jurel.pdf].

Kolkovski, S., Sakakura, Y., 2004. Yellowtail kingfish, from larvae to mature fish – problem and opportunities. Em: Cruz Suarez, L. E., Ricque Marie, D. Nieto López, M. G., Villareal, D., SCHOLZ, U., González, M. Avances en nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, pp, 109 -125. [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/5SagivKolkovski.pdf]

Legarda et al., dados não publicados. Performance of *Ulva* sp. in an integrated cultivation of shrimp and mullet in biofloc system.

McCauley et al., 2016. Parameters affecting the analytical profile of fatty acids in the macroalgal genus Ulva. Food Chemistry, 209, 332–340. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.039

Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poult. Sci. 31, 735–738.

NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC. www.nap.edu.

Ortiz., J., et al., 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds Ulva lactuca and Durvillaea antarcticaFood Chemistry, 99, 98–104.

Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., González-Bermúdez, C. A., Ros-Berruezo, G. F., Martínez-Graciá, C., 2012. Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. Revista de biología marina y oceanografía, 47, 373-381.

Nakagawa, 1997. Dosiet: Nutrition. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. Biomed & Pharmacother,5, pp. 345-348.

Rodrigues, M. S., Bolívar, N., Legarda, E. C., Guimarães, A. M., Guertler, C., Do Espírito Santo, C. M., Mouriño, J. L. P., Seiffert, W. Q., Fracalossi, D. M. & Do Nascimento Vieira, F., 2018. Mannoprotein dietary supplementation for Pacific white shrimp raised in biofloc systems. Aquaculture, 488, 90-95.

Rombenso, A., et al., 2016. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) are essential to meet LC-PUFA requirements of juvenile California Yellowtail, Aquaculture 463. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.004

Saito, 2012. Lipid characteristics of two subtropical *Seriola* fishes, *Seriola dumerili* and *Seriola rivoliana*, with differences between cultured and wild varieties, Food Chemistry, 135, 1718–1729. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.122

Sakakura, Y., Tsukamoto, K., 1999. Ontogeny of aggressive behavior in schools of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Environmental Biology of Fishes, v 56, pp 231-242. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-3678-7_16].

Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D., Ringø, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. Fish Shellfish Immunol. 40, 40–48.

Schleder, D. D., Blank, M., Peruch, L. G. B., Vieira, F. D. N., Andreatta, E. R. Hayashi, L., 2017. Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. Aquaculture, 481, 103-111.

Schleder, D. D., Peruch, L. G. B., Poli, M. A., Ferreira, T. H., Silva, C. P., Andreatta, E. R., Hayashi, L. Nascimento Vieira, F., 2018. Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. Aquaculture, 495, 359-365.

Schleder, D. D., Blank, M., Peruch, L. G. B., Poli, M. A., Gonçalves, P., Rosa, K. V., Fracalossi, D. M., Vieira, F. D. N., Andreatta, E. R., Hayashi, L., 2019. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. Aquaculture, 734779.

Valente, L. M. P., Araújo, M., Batista, S., Peixoto, M. J., Sousa-Pinto, I., Brotas, V., Cunha, L. M., Rema, P., 2016. Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva* spp. Journal of Applied Phycology, 28, 691-701.

Viana, M..T. et al., 2019. Intestinal impairment of the California yellowtail, *Seriola dorsalis*, using soybean meal in the diet, Aquaculture 513. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734443

Wassef, E. A., El-Sayed, A.-F. M., Sakr, E. M., 2013. Pterocladia (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. Journal of Applied Phycology, 25, 1369-1376.

Wegner, N.C. et al., 2018. Reduced swimming and metabolic fitness of aquaculture-reared California Yellowtail (*Seriola dorsalis*) in comparison to wild-caught conspecifics. Aquaculture, 486, pp. 51-56. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.041

Zar, J.H., 2010. Biostatistical Analysis, fifth ed. Pretice Hall, New Jersey.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é o primeiro reporte que as tainhas podem se alimentar dos bioflocos excedentes do cultivo de camarão. Recomenda-se avaliar o sistema sem a adição de dietas para as tainhas para descobrir se os bioflocos cumprem as exigências nutricionais dos peixes. Descobrimos que as tainhas tem um limite de carga no sistema integrado com camarão em bioflocos, futuras pesquisas poderiam avaliar se utilizando substratos artificiais, por exemplo, é possível incrementar essa capacidade suporte.

As tainhas utilizadas nos dois primeiros experimentos foram selvagens (*Mugil curema*) e antes de começar o experimento tiveram surtos de parasitas e problemas de adaptação ao alimento, inclusive se observou um possível comportamento de canibalismo durante esse período. Assim estudos futuros poderiam avaliar qual é a melhor maneira de aclimatar os peixes e evitar surtos de parasitas. O terceiro experimento já foi realizado com tainhas de geração F1 (*Mugil liza*) provenientes do Laboratório de Piscicultura Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina, as quais tiveram uma aclimatação curta ao sistema de BFT, um dia, e se obtiveram ótima sobrevivência. Espera-se que a domesticação da espécie provavelmente melhore os índices zootécnicos.

A procedência das macroalgas (*Ulva fasciata*) utilizadas no sistema integrado com camarão e tainha em bioflocos foi da coleta na praia, recomenda-se desenvolver um sistema de produção constante em laboratório para disponibilizar talos de ulvas durante o ano todo futuramente para uma produção em sistema de bioflocos. Também estudos futuros poderiam avaliar se é possível aumentar a densidade algal para obter absorção significativa de nutrientes da água e assim ajudar na biorremediação do sistema.

A utilização da *Ulva fasciata* como aditivo alimentar nas dietas para peixes marinhos tem potencial como promotor de crescimento e como descobrimento inovador é que essa macroalga pode incrementar o conteúdo de DHA e de ARA no músculo, assim estudos futuros poderiam avaliar a adição de *Ulva* em peixes marinhos de interesse comercial e se a adição de *Ulva* ajuda a melhorar a qualidade do filé. Da mesma maneira estudos futuros podem avaliar o efeito do polissacarídeo ulvana como prebiótico ou simbiótico com outros organismos.

Além dos resultados mostrados na presente tese se realizou um experimentos piloto com outra macroalga que também tem potencial no sistema multitrófico, a *Kappaphycus*, se obtiveram bons resultados e se recomenda avaliar especificamente se esta macroalga poderia

absorver nutrientes e se a água do sistema de bioflocos é um meio de cultura que pode melhorar as características da qualidade da alga, como por exemplo a carragenana.

Baseado nos resultados da tese se recomenda continuar com pesquisas que avaliem outras espécies potenciais no sistema multitrófico e que tenham valor comercial. Recomenda-se também avaliar dietas econômicas sustentáveis para sistemas multitrófcos que potencializem a sustentabilidade do sistema, considerando que aumenta a retenção de fósforo e nitrogênio.

Também se sugere que trabalhos futuros avaliem fisiologicamente de que maneira a adição da farinha da macroalga *Ulva fasciata* pode incrementar o ácido graxo DHA no filé. Sugere-se pesquisar a adição da *Ulva* em dietas para camarão com o intuito de avaliar esse potencial de incrementar os ácidos graxos de interesse comercial.

Finalmente, se sugere avaliar todo o sistema em larga escala e que seja aplicado de maneira comercial mudando a visão da aquicultura para uma aquicultura mais sustentável que aproveitem os recursos naturais responsavelmente, assim como que reutilize os insumos, gerando um equilíbrio técnico, ambiental e econômico nos cultivos.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados da presente tese podemos concluir que é possível melhorar ainda mais o cultivo de camarão em bioflocos em termos de produtividade e de eficiência ecológica aplicando os conceitos de aquicultura multitrófica integrada com tainha e a macroalga *Ulva fasciata*. A integração com tainha melhora a produtividade e aumenta a retenção de fósforo, também se encontrou a capacidade suporte da tainha dentro do sistema integrado em bioflocos. A *Ulva fasciata* dentro do sistema integrado além de incrementar a produtividade, retenção de fósforo e nitrogênio, aumentou o teor de compostos antioxidantes sem afetar o rendimento de ulvana.

Além disso, a macroalga produzida no sistema integrado em bioflocos tem potencial como aditivo alimentar para o olhe-te (*Seriola dorsalis*), tendo potencial como promotor de crescimento e podendo incrementar o teor de ácidos graxos PUFA como o DHA no filé.

Assim, a presente tese desenvolveu um sistema de produção sustentável que utiliza os rejeitos do cultivo de camarão como alimento e fertilizante para outras espécies e o produto dessa produção com rejeitos pode gerar um novo produto que pode ser aplicado na própria atividade aquícola, gerando uma economia circular.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ANRAKU, M., AZETA, M. The feeding habits of larvae and juveniles of yellowtail, Seriola quinqueradiata Temminck et Schlegel associated with floating seageeds. **Bulletim of the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory**, v. 33, pp. 14-15, 1965.

ABREU, M. H. et al. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. **Aquaculture**, v. 312, n. 1–4, p. 77-87, 2011. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611000135].

ABREU, M. H. et al. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of Gracilaria chilensis C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. **Aquaculture**, v. 293, n. 3-4, p. 211-220, 2009.

AVNIMELECH, Y. et al. **Biofloc Technology**. Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society, 2010. 272.

AVNIMELECH, Y. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3-4, p. 227-235, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X].

BRITO, L. O. et al. Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linaeus) in intensive system. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 497-508, 2014. Disponível em: [Go to ISI>://WOS:000332315700013].

BRITO, L. O. et al. Water quality, Vibrio density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). **Aquaculture Research**, p. 11 2014.

BURFORD., et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. Aquaculture, v. 232, n. 1-4, pp 525-537, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6].

CARVALHO et al., 2019. Maturation, spawning and larviculture of the mullet *Mugil liza* under laboratory conditions. **Rev Bras Reprod Anim**, v.43, n.1, p.31-36, 2019.

CHAROENSIDDHI, S. et al. Seaweed and seaweed-derived metabolites as prebiotics. In: (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research: Academic Press**, 2019.

CHOPIN, T. et al. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. **Journal of Phycology**, v. 37, p. 975–986, 2001.

CHOPIN, T. Integrated Multi-Trophic Aquaculture What it is, and why you should care….. and don't confuse it with polyculture. **Northern Aquaculture**, p. 4, 2006.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 346-358, 2006.

EMERENCIANO, GAXIOLA, CUZON. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. Cap. 2. Em: MATOVIC, M. D. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. 2013. Disponível em: [10.5772/53902].

ELLEN MACARTHUR FOUNDATION. **Towards the circular economy: economic and business rationale for an accelerated transition**, v.1, 2013. Disponível em: [https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/publications/Ellen-MacArthur-Foundation-Towards-the-Circular-Economy-vol.1.pdf].

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura Oportunidades y desafíos**. Roma, p.253. 2016.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018**: **Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Roma. p. 233, 2018.

FAO-FIGIS. Global Aquaculture Production 1950-2017. Data da pesquisa: 03 de dezembro de 2019. Disponível em [http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY].

FERREIRA, G. S. et al. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. **Aquacultural Engineering**, v. 88, p. 102040, 2020. ISSN 0144-8609. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860919300494].

FROEHLICH, H. E. et al. Blue Growth Potential to Mitigate Climate Change through Seaweed Offsetting. **Current Biology**, 2019. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982219308863].

FURTADO et al. Short communication: Acute toxicity of hydrogen peroxide in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology systems. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, pp 653–659. 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/s10499-013-9694-x].

GRAHAM, L. E., WILCOX, L. W., GRAHAM, J. M. **Algae**. 2nd. ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2009, p 616.

HARGREAVES, J. A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacultural Engineering** v. 34, p. 344–363, 2006.

HAAS, W. How Circular is the Global Economy?An Assessment of Material Flows, Waste Production, andRecycling in the European Union and the World in 2005. Journal of Industrial Ecology, v. 19, n. 5, 2015. Disponível em: [DOI: 10.1111/jiec.12244].

HOANG, M. N.; NGUYEN, P. N.; BOSSIER, P. Water quality, animal performance, nutrient budgets and microbial community in the biofloc-based polyculture system of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and gray mullet, *Mugil cephalus*. **Aquaculture**, v. 515, p. 734610, 2020. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848619310531].

Instituto Nacional de Pesca do Governo de México. **Jurel**. Diário oficial, junio de 2012. Disponível em: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308116/03jurel.pdf].

KOLKOVSKI, S., SAKAKURA, Y. Yellowtail kingfish, from larvae to mature fish – problem and opportunities. Em: CRUZ SUAREZ, L. E., RICQUE Marie, D. NIETO LÓPEZ, M. G., VILLAREAL, D., SCHOLZ, U., GONZÁLEZ, M. **Avances en nutrición Acuícola VII**. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, pp, 109 -125. 2004. Disponível em: [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/5SagivKolkovski.pdf]

KÖNIG, B. et al. Analysis of aquaponics as an emerging technological innovation system. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 232-243, 2018. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618300489].

KRUMMENAUER, D, et al. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp,Litopenaeus vannamei, in BFT System. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, pp. 3-14, 2014. Disponível em: [doi: 10.1111/jwas.12093].

LEGARDA, E. C. et al. Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. **Aquaculture**, v. 512, p. 734308, 2019. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848619301115].

LEMOS, V. M., et al. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 85, pp. 671-687. 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1111/jfb.12452].

LIN, Y. C.; CHEN, J. C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture, v. 224, n. 1-4, p. 193-201, 2003.

MPA/MMA (Ministério da Pesca e Aquicultura, Ministério do Meio Ambiente), 2015. Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no sudeste e sul do Brasil. MAPA/MMA, Brasília, DF.

MARISCAL-LAGARDA, M. M.; PÁEZ-OSUNA, F. Mass balances of nitrogen and phosphorus in an integrated culture of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: A short communication. **Aquacultural Engineering**, v. 58, p. 107-112, 2014. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860913001246].

MARTINS, M. A. et al. Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. **Aquaculture**, p. 734517, 2020. ISSN 0044-8486. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848619318046].

MELO, E.P., et al. Monocultivo e policultivo do camarão Litopenaeus schmitti e do parati *Mugil curema* em sistema de bioflocos e água clara. **Bol. Inst. Pesca**, n. 42, v. 3, pp. 532–547. 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p532].

MSUYA, F.; NEORI, A. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 6, p. 1021-1031, 2008.

NALDI, M.; WHEELER, P. A. N-15 measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (rhodophyta): Comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and N-15 accumulation in algal tissue. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 1, p. 135-144, 2002.

NELSON J. S. **Fishes of the world**. 4th edition, John Wiley & Sons, Inc., 601 pp. 2006.

NASH C. E., SHEHADEH Z. H. Review of breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus* L. ICLARM Studies and Reviews 3, 87 pp. 1980. Disponível em: [https://digitalarchive.worldfishcenter.org/bitstream/handle/20.500.12348/3698/Pub%20SR76%203.pdf?sequence=1&isAllowed=y].

NEORI, A. et al. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modem mariculture. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 361-391, 2004.

OECD. "Eco-Innovation Policies in The People's Republic of China", Environment Directorate, OECD. 2009. Disponível em: [https://www.oecd.org/china/44293445.pdf].

PALLAORO, M. F.; VIEIRA, F.; HAYASHI, L. *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-7, 2016.

PESO-ECHARRI, Patricia et al. Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. **Rev. biol. mar. oceanogr**., v. 47, n. 3, p. 373-381, 2012. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001].

PINHEIRO, I. et al. Production of the halophyte *Sarcocornia ambigua* and Pacific white shrimp in an aquaponic system with biofloc technology. **Ecological Engineering**, v. 100, p. 261-267, 2017. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857416307388].

POLI, M.A., LEGARDA, E.C., LORENZO, M.A., MARTINS, M.A., NASCIMENTO VIEIRA, F. Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. **Aquaculture** 498, 83-89. 2019a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045]

POLI, M. A. et al. Integrated multitrophic aquaculture applied to shrimp rearing in a biofloc system. **Aquaculture**, v. 511, p. 734274, 2019b. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848618327418].

RAY, A. J. et al. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, n. 1-2, p. 130-138, 2010. Disponível em: [10.1016/j.aquaculture.2010.10.019].

ROOS, B., et al. Linking agroecosystems producing farmed seafood with food security and health status to better address the nutritional challenges in Bangladesh. **Public Health Nutrition**, pp. 1-9. 2019. Disponível em [doi:10.1017/S1368980019002295].

SAKTHIVEL, R.; DEVI, K. P. Chapter 5 - Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer potential of natural bioactive compounds from seaweeds. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v.63, 2019. p.113-160. ISBN 1572-5995.

SAKAKURA, Y., TSUKAMOTO, K., Ontogeny of aggressive behavior in schools of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Environmental Biology of Fishes**, v 56, pp 231-242, 1999. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-3678-7_16].

SAMOCHA, T.M., et al. Recent advances in super-intensive, zero-exchange shrimp raceway systems. **Global Aquaculture Advocate**, v. 15, n. 6, p. 70–71, 2012.

SANT-ANA, R., KINAS, P. G. RELATORIO II – Avaliação de estoque – Tainha. OCEANA protegendo os oceanos do mundo. Disponível em: [https://brasil.oceana.org/sites/default/files/avaliacao_de_estoque_tainha_oceana_-_integra.pdf].

SANDIFER, P. A., HOPKINS, J. S. Conceptual Design of a Sustainable Pond-based Shrimp Culture System**. Aquacultural Engineering**, v. 15, n. 1, pp. 41-52, 1996.

SILVA, K., WASIELESKY, W., ABREU, P. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the**

World Aquaculture Society. v. 44, n. 1., pp . 30-41. 2013.

SCHLEDER, D. D. et al., Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, pp 2471–2477. 2017. Disponível em: [https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-017-1129-z].

SCHVEITZER, R. et al. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. **Aquacultural Engineering**, v. 56, p. 59-70, 2013b.

SCHVEITZER, R. et al. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. **Aquacultural Engineering**, v. 54, p. 93-103, 2013a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.12.003].

THOMSON J. M. Mugilidae. In: **FAO species identification sheets for fishery purposes**. Western Indian Ocean (fishing area 51). Fischer W., Bianchi G. (eds). FAO, Rome, v, 1-6. 1983. Disponível em: [http://www.fao.org/3/ad468e/ad468eHY.pdf].

TROELL, M. et al. Integrated mariculture: asking the right questions. **Aquaculture**, v. 226, n. 1-4, p. 69-90, 2003. ISSN 0044-8486.

VINATEA, L., et al. A comparison of recirculation aquaculture systems versus biofloc technology culture system for on-growing of fry of *Tinca tinca* (Cyprinidae) and fry of grey *Mugil cephalus* (Mugilidae). **Aquaculture**, v. 482, pp. 155–161. 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.041].

VIZCAÍNO, A. J., et al. Evaluation of Ulva ohnoi as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. **Algal Research**, v. 42, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101608].

WASIELESKY, W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1, p. 396-403, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030].

FOC (Fisheries and Oceans Canada). AQUACULTURE in Canada: Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA). Disponível em: [https://waves-vagues.dfo-mpo.gc.ca/Library/365660.pdf].