

Wesley Freitas da Anunciação

Influência de fatores abióticos na produção do copépode
Bestiolina similis e do protozoário ciliado *Euplotes sp.*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Doutor em Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis - SC
2016

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

Annuniação, Wesley Freitas da
Influência de fatores abióticos na produção do copépode
Bestiolina similis e do protozoário ciliado Euplotes sp. /
Wesley Freitas da Annuniação ; orientadora, Mônica Yumi
Tsuzuki - Florianópolis, SC, 2016.
164 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Fatores Abióticos. 3. Alimento vivo.
4. Copépode. 5. Ciliado. I. Yumi Tsuzuki, Mônica. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Aquicultura. III. Título.

Influência de fatores abióticos na produção do copépodo *Bestiolina similis* e do protozoário ciliado *Euplotes SP*

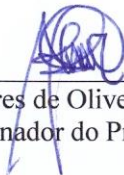
Por

WESLEY FREITAS DA ANNUNCIÇÃO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

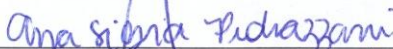


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

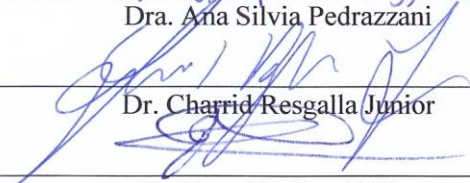
Banca Examinadora:



Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Presidente*



Dra. Ana Silvia Pedrazzani

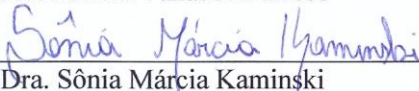


Dr. Charid Resgalla Junior

Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dra. Márcia Vanacor Barroso



Dra. Sônia Márcia Kaminski

Dedico este trabalho a minha família, minha mãe Ademilde, meu pai Pedro, e a minha namorada Lilian, pelo o amor, compreensão e encorajamento.

“Opte por aquilo que faz seu coração vibrar,
apesar de todas as consequências”

Osho

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Ademilde e Pedro, que sempre me inspiraram a ser uma pessoa melhor, digna; que me ensinaram que é preciso lutar pelos nossos sonhos, nossos ideais e estiveram sempre me apoiando nos momentos de dificuldade. Obrigado, eu amo muito vocês.

Agradeço a minha linda namorada, Lilian Poletto, pelo amor, pela cumplicidade, pela parceria e pela paciência (que não foi pouca!).

A toda minha família.

Agradeço a minha orientadora Mônica Yumi Tsuzuki pela confiança, pela orientação, pelo apoio e pela amizade. Agradeço também ao professor Cortney Ohs pelo apoio, estando sempre disposto a ajudar, e pela amizade.

A todo pessoal do LAPMAR, do LAPOM, do LMM, do LCM, principalmente aos técnicos e amigos que tanto me ajudaram, Gabriel, Cris, Tatu, Jaqueline, Salete, Sayão, Renata, Fábio, Dani e a todos os colegas de mestrado e doutorado. Agradeço ao pessoal do Departamento de Botânica da UFSC, do Instituto Oceanográfico – SP e do Departamento de Taxonomia da UFES pela ajuda, que foi fundamental.

Aos meus companheiros do Beco dos Coroas, Maik, Cristiele, Titi, Gabriel, Raoani, Fábio Stlescki, Cristina, Rê, Zizu. Aos grandes amigos que fiz em Vero, Carter Cyr, Isaac Lee, John e Andrew e as minhas vizinhas queridas Lika, Nay e Lud.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Aquicultura, pelo conhecimento compartilhado, por toda a atenção e ajuda.

Ao Cnpq e a CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

A aquicultura é a área com maior crescimento em nível mundial para produção de proteína animal, sendo que a piscicultura marinha é responsável por cerca de 9% da produção gerada pela maricultura. Porém, os alimentos vivos tradicionalmente utilizados na larvicultura de peixes marinhos, os rotíferos e artêmia, não são capazes de suportar o desenvolvimento adequado de larvas de diversas espécies de peixes, limitando assim a atividade. Alimentos vivos alternativos vêm sendo estudados ao longo das últimas décadas, porém ainda se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias e de protocolos de produção. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar o efeito dos fatores abióticos, temperatura, fotoperíodo e salinidade, e também da concentração de alimento na produtividade do copépode *Bestiolina similis* e do protozoário *Euplotes* sp., para se determinar uma faixa adequada para produção desses organismos. No primeiro estudo foi possível verificar que a temperatura afetou o crescimento e a reprodução de *B. similis*, sendo que a faixa entre 24 e 32 °C é adequada para produção da espécie, proporcionando elevada taxa de crescimento e fecundidade. Ao avaliarmos o efeito do fotoperíodo, observamos que a privação de luz provocou um efeito negativo sobre diversos parâmetros produtivos do copépode e que ciclos luminosos acima de 12 horas de luz podem ser utilizados para maximizar a produtividade. No terceiro estudo foi observado que o copépode *B. similis* é uma espécie que se adapta bem à ampla faixa de salinidade, sendo que os animais mantidos na faixa entre 25 e 35 g . L⁻¹ apresentaram elevada fecundidade e rápido desenvolvimento. Foi possível observar também que o ciliado *Euplotes* sp. apresentou características favoráveis à produção massiva, como elevada taxa de crescimento; se adapta bem em diferentes condições de salinidade e temperatura e é resistente às condições adversas, como elevadas concentrações de amônia tóxica e baixos níveis de oxigênio dissolvido. Foram determinadas como faixas mais adequadas para a produção do ciliado *Euplotes* sp. a temperatura entre 26 e 32°C; salinidade entre 20 e 35 g . L⁻¹, concentração de alimento de 250 mg de Protein Selco® . 10⁻⁶ ciliados; fotoperíodo entre 0 e 16 h de luz e baixos níveis ou ausência de aeração.

Palavras-chave: Copépode, Ciliado, Alimento vivo, Fatores Abióticos, Aquicultura.

ABSTRACT

Aquaculture is the fastest growing area in worldwide for the production of animal protein, and marine fish farming accounts for about 9% of mariculture production. However, the live feeds traditionally used in marine fish larviculture, rotifers and artemia, are not able to support the proper development of several species fish larvae, thereby limiting the activity. Alternative live feeds have been studied over the past decades, but the development of technologies and protocols still is required. The objective of this study was to evaluate the effect of abiotic factors, temperature, photoperiod and salinity, in the productivity of copepod *Bestiolina similis* and the protozoa *Euplotes* sp., to determine an appropriate range for production of these organisms. In the first study, we found that the temperature affected the growth and reproduction of *B. similis* and the range between 24 and 32 ° C is suitable for producing this species, providing high growth rates and fecundity. To evaluate the effect of photoperiod, we found that the light deprivation had a negative effect on various production parameters of the copepod and the cycles above 12 hours of light can be used to maximize productivity. In the third study was observed that the copepod *B. similis* is able to adapts well to the wide range of salinity, and the animals kept between 20 and 30 g. L⁻¹ had a high fertility and fast development. We also conclude that the ciliate *Euplotes* sp. showed characteristics favorable to mass production for aquaculture, as resistance to adverse conditions, including high concentrations of total ammonia and low oxygen levels; they present high growth rate; accepted sources of food as inert diet; and adapts well to different conditions of salinity and temperature. Was possible observe the proper range for the production of the ciliated the temperature between 26 and 32 ° C; salinity between 20 and 35 g. L⁻¹, feed concentration of 250 mg . Protein Selco® . 10⁻⁶ cells; photoperiod between 0 and 16 light hours and should be kept at low levels or absence of aeration.

Keywords: Copepod, Ciliate, Live feeds, Abiotic parameters, Aquaculture.

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| 1.1. | SITUAÇÃO DA PISCICULTURA MARINHA NO MUNDO..... | 21 |
| 1.2 | ALIMENTOS VIVOS TRADICIONALMENTE UTILIZADOS NA AQUICULTURA | 22 |
| 1.3 | USO DE DIETAS INERTES | 23 |
| 1.4 | ALIMENTOS VIVOS ALTERNATIVOS | 23 |
| 1.5 | COPÉPODES | 24 |
| 1.6 | COPÉPODES CALANOIDA | 26 |
| 1.7 | <i>Bestiolina similis</i> | 26 |
| 1.8 | DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DE COPÉPODES | 28 |
| 1.9 | PRODUÇÃO DE COPÉPODES EM AMBIENTE CONTROLADO | 29 |
| 1.10 | IMPORTÂNCIA DOS CILIADOS..... | 31 |
| 1.11 | <i>Euplotes</i> sp..... | 32 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 35 |
| 3 | OBJETIVOS | 35 |
| | OBJETIVO GERAL..... | 35 |
| 4 | FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS | 36 |
| | CAPÍTULO I..... | 37 |
| | INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO POPULACIONAL, PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPÉPODE <i>Bestiolina similis</i> | 37 |
| 5 | RESUMO..... | 38 |
| 6 | ABSTRACT | 39 |
| 7 | INTRODUÇÃO | 40 |

| | | |
|-----|--|----|
| 8 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 8.1 | COLETA, IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS COPÉPODES.... | 41 |
| 8.2 | DESENHO EXPERIMENTAL | 42 |
| 8.3 | EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA TEMPERATURA | 42 |
| 8.4 | ACLIMATAÇÃO DOS COPÉPODES ÀS DIFERENTES TEMPERATURAS | 42 |
| 8.5 | EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 43 |
| 8.6 | EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 44 |
| 8.7 | EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO | 45 |
| 8.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 46 |
| 9 | RESULTADOS..... | 46 |
| 9.1 | EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA TEMPERATURA | 46 |
| 9.2 | EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 47 |
| 9.3 | EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 50 |
| 9.4 | EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE TAXA DE ECLOSÃO | 54 |
| 11 | CONCLUSÃO | 59 |
| 12 | AGRADECIMENTOS..... | 59 |
| 13 | REFERÊNCIAS | 59 |
| | CAPÍTULO II..... | 65 |
| | INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NO CRESCIMENTO POPULACIONAL, PERÍODO DESENVOLVIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPÉPODE <i>Bestiolina similis</i> | 65 |
| 14 | RESUMO | 66 |

| | | |
|------|---|----|
| 15 | ABSTRACT | 67 |
| 16 | INTRODUÇÃO..... | 68 |
| 17 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 69 |
| 17.1 | COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO COPÉPODE..... | 69 |
| 17.2 | MANUTENÇÃO DO COPÉPODE <i>B. similis</i> | 69 |
| 17.3 | DESENHO EXPERIMENTAL | 70 |
| 17.4 | EXPERIMENTO 1: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 70 |
| 17.5 | EXPERIMENTO 2: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 71 |
| 17.6 | EXPERIMENTO 3: FECUNDIDADE | 72 |
| 17.7 | EXPERIMENTO 4: TAXA DE ECLOSÃO..... | 73 |
| 17.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 73 |
| 18 | RESULTADOS..... | 73 |
| 18.1 | EXPERIMENTO 1: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 73 |
| 18.2 | EXPERIMENTO 2: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 76 |
| 18.3 | EXPERIMENTO 3: FECUNDIDADE | 79 |
| 18.4 | EXPERIMENTO 4: TAXA DE ECLOSÃO..... | 80 |
| 19 | DISCUSSÃO..... | 80 |
| 20 | CONCLUSÕES | 82 |
| 21 | AGRADECIMENTOS | 82 |
| 22 | REFERÊNCIAS | 83 |
| | CAPÍTULO III..... | 87 |
| | INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPÉPODE <i>Bestiolina similis</i> | 87 |

| | | |
|------|--|-----|
| 23 | RESUMO | 88 |
| 24 | ABSTRACT | 89 |
| 25 | INTRODUÇÃO | 90 |
| 26 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 91 |
| 26.1 | OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE COPÉPODES..... | 91 |
| 26.2 | DESENHO EXPERIMENTAL | 92 |
| 26.3 | EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA SALINIDADE..... | 92 |
| 26.4 | ACLIMATAÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES..... | 93 |
| 26.5 | EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 93 |
| 26.6 | EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 94 |
| 26.7 | EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO | 95 |
| 26.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 96 |
| 27 | RESULTADOS..... | 96 |
| 27.1 | EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA SALINIDADE..... | 96 |
| 27.2 | EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL..... | 97 |
| | | 100 |
| 27.3 | EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA..... | 101 |
| 27.4 | EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO | 104 |
| 28 | DISCUSSÃO | 106 |
| 29 | CONCLUSÃO | 109 |
| 30 | AGRADECIMENTOS..... | 109 |
| 31 | REFERÊNCIAS | 109 |
| | CAPÍTULO IV | 115 |

| | | |
|-------|--|-----|
| | INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS E DA CONCENTRAÇÃO DE ALIMENTO NO CRESCIMENTO DO PROTOZOÁRIO CILIADO..... | 115 |
| 32 | RESUMO..... | 116 |
| 33 | ABSTRACT | 116 |
| 34 | INTRODUÇÃO..... | 117 |
| 35 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 119 |
| 35.1 | LOCAL EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS..... | 119 |
| 35.2 | DESENHO EXPERIMENTAL | 120 |
| 35.3 | EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALIMENTO (C) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 121 |
| 35.4 | EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SALINIDADES (S) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 121 |
| 35.5 | EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS (T) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 121 |
| 35.6. | EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (TA) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 122 |
| 35.7 | EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS (F) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 122 |
| 35.8 | TAXA DE CRESCIMENTO..... | 122 |
| 35.9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 123 |
| 36 | RESULTADOS..... | 123 |
| 36.1 | EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALIMENTO (CA) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes sp.</i> | 123 |
| 36.2 | EXPERIMENTO 2: EFEITO DA SALINIDADE (S) NO CRESCIMENTO DE..... | 127 |

| | |
|---|-----|
| 36.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS (T) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes</i> sp. | 130 |
| 36.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS (F) NO CRESCIMENTO DE <i>Euplotes</i> sp. | 136 |
| 38 CONCLUSÃO | 142 |
| 39 AGRADECIMENTOS..... | 142 |
| 40 REFERÊNCIAS | 142 |
| 41 CONCLUSÕES GERAIS | 147 |
| 42 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO | 149 |
| 43 APÊNDICE | 160 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. SITUAÇÃO DA PISCICULTURA MARINHA NO MUNDO

A aquicultura é a área com maior crescimento em nível mundial para produção de proteína animal (FAO, 2010). No ano de 2012 a maricultura atingiu a produção de 24,6 milhões de toneladas, gerando o valor aproximado de 57 bilhões de dólares (FAO, 2014). Desse montante a piscicultura marinha representou cerca de 9% (2,18 milhões de toneladas) da produção e 15,7 % (9 bilhões de dólares) do valor arrecadado (FAO, 2014). Apesar da atividade apresentar um crescimento anual superior a 5 %, a produção de peixes marinhos ainda possui diversos gargalos, sendo que um dos principais é a produção e a disponibilidade de formas jovens (LUBZENS et al., 1997; QIN, 2013).

Muitas espécies de peixes marinhos apresentam elevadas taxas de mortalidade e de deformidades durante a etapa de larvicultura (RAJKUMAR; KUMARAGURU, 2006), principalmente durante o período de transição da alimentação endógena para a exógena (TURINGAN et al., 2005; OLIVOTTO et al, 2010). Grande parte dessa mortalidade ocorre devido à diversas espécies produzidas em cativeiro possuírem larvas altriciais, que apresentam escassa reserva de vitelo, trato digestório rudimentar e baixa atividade enzimática (CONCEIÇÃO et al., 2010). Devido a essas características, essas larvas são altamente dependentes do alimento externo, sendo de vital importância fornecer organismos que atendam às exigências nutricionais das larvas e possuam tamanho e padrão natatório adequados, evitando o processo de inanição e de mortalidade em massa (CAHU; ZAMBONINO INFANTE, 2001; JEPSEN, 2014).

Para o sucesso da atividade é fundamental que sejam produzidos alimentos vivos de alta qualidade, que proporcionem elevadas taxas de sobrevivência, crescimento adequado das larvas e que apresentem viabilidade econômica de produção (STØTTRUP, 2003). Essas características são particularmente importantes quando considerada a produção de espécies marinhas com elevado valor comercial e alta demanda, como as garoupas, pargos, linguados e atuns, principalmente para aquelas que possuem maior exigência quanto a alimentação inicial (SHIELDS et al., 1999; BELL et al., 2003; STØTTRUP, 2003; ENGELL-SØRENSEN et al., 2004; SAKAKURA et al., 2006; NAKAGAWA et al., 2011).

Diversos estudos vêm sendo realizados ao longo das últimas décadas investigando técnicas de produção e de enriquecimento nutricional

para os alimentos vivos. Em paralelo também são realizadas pesquisas investigando o potencial e a utilização de alimentos vivos alternativos e o desenvolvimento de microdietas inertes (CAHU; INFANTE, 2001; STØTTRUP, 2003; DRILET et al., 2011).

1.2 ALIMENTOS VIVOS TRADICIONALMENTE UTILIZADOS NA AQUICULTURA

As larvas de peixes marinhos consomem uma vasta gama de alimentos no ambiente natural, como dinoflagelados, ciliados, apendiculários, larvas de moluscos, ovos e náuplios de copépodes (RILEY; HOLT, 1993; HOLT; HOLT, 2000). Porém dentro da piscicultura marinha o alimento fornecido às larvas é limitado basicamente aos rotíferos (*Brachionus* sp.) e a artêmia (*Artemia* sp.) (STØTTRUP, 2003). Esses organismos são amplamente utilizados na produção aquícola e possuem diversas vantagens, como a obtenção de elevada densidade, fácil manejo, possibilidade de armazenamento por períodos prolongados, aceitam dietas inertes e podem ser enriquecidos com emulsões de ácidos graxos (LAVENS; SONGERLOOS, 1996; STØTTRUP, 2003), sendo responsáveis por dar suporte à produção comercial de várias espécies produzidas em cativeiro na atualidade (STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010). Porém, esses organismos não são aceitos como alimento nas etapas iniciais da larvicultura de diversos grupos de peixes com grande importância comercial, devido às deficiências nutricionais, inadequação do tamanho e padrão de locomoção (SCHIPP, 2006; SOLGAARD; STANDAL; DRAGET 2007; OLIVOTTO et al., 2010; LIMA; NAVARRO; SOUZA-SANTOS, 2013).

Após a realização de diversos estudos, já é bem conhecido que o rotífero e a artêmia são deficientes em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), principalmente os ômega 3, DHA (22:6n-3) e EPA (20:5n-3) (RAINUZZO et al., 1997; SARGENT et al., 1999). Mesmo com o uso de diversas técnicas de enriquecimento, com produtos comerciais e emulsões de óleos (SHIELDS et al. 1999; SORGELOOS et al. 2001), esses organismos ainda não conseguem suprir a proporção adequada de DHA / EPA exigida por muitas larvas marinhas (NAVARRO 1999; SHIELDS et al. 1999; SCHIPP, 2006). Os lipídeos essenciais presentes na dieta, principalmente os ômega 3 de cadeia longa, são de fundamental importância, pois representam a principal fonte energética das larvas de peixes marinhos durante as fases iniciais (BELL et al., 2003) e são fundamentais no desenvolvimento de tecidos neurais e

membranas celulares (SARGENT et al., 1999). O desequilíbrio nutricional das larvas atrapalha a morfogênese e a esqueletogênese, afetando conseqüentemente o desenvolvimento e a sobrevivência dos animais (CAHU; ZAMBONINO INFANTE, 2001; BOGLINO et al., 2012).

1.3 USO DE DIETAS INERTES

A utilização de dietas inertes como substituto do alimento vivo nas fases iniciais da larvicultura ainda não é uma alternativa viável para a grande maioria das espécies marinhas produzidas, devido à baixa digestibilidade e a qualidade nutricional inadequada das dietas formuladas (CAHU; ZAMBONINO INFANTE, 2001; CONCEIÇÃO et al., 2010). O alimento vivo além de apresentar elevada quantidade de água na sua composição, o que melhora a sua digestibilidade (CONCEIÇÃO et al., 2010), ainda possui a vantagem da motilidade, o que estimula a atividade alimentar das larvas e taxa de ingestão de alimento (KOLKOVSKI, 2001; STØTTRUP, 2003), enquanto as dietas inertes possuem a tendência de se agregar na superfície da água, ou o que é mais comum, tendem a afundar, se tornando menos disponíveis para as larvas (STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010).

Outro ponto crítico que dificulta a aceitação das dietas inertes é em relação ao tamanho das partículas de alimento, que devem ser menores que o tamanho de abertura da boca das larvas e ainda devem apresentar boa palatabilidade para os animais (BENGTSON, 2003). Novas técnicas de microencapsulação vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de microdietas utilizadas na larvicultura, porém a utilização dessas dietas tem apresentado resultados mais promissores na produção de larvas de camarões, as quais são capazes de manipular melhor o alimento, do que as larvas de peixes (STØTTRUP, 2003).

1.4 ALIMENTOS VIVOS ALTERNATIVOS

Segundo alguns autores o reduzido número de espécies de peixes marinhos produzidas em cativeiro na atualidade é uma consequência da falta de um alimento vivo adequado, sendo este um dos principais fatores que limitam a larvicultura em escala comercial (PAYNE; RIPPINGALE, 2001; HOLT, 2003; AJIBOYE et al., 2011). Com isso se faz necessária a busca por dietas alternativas, principalmente pelo aumento na demanda da produção aquícola e da quantidade de espécies produzidas em cativeiro (STØTTRUP, 2001; DRILLET et al., 2011; KLINE; LAIDLEY, 2015).

Diversos alimentos alternativos vêm sendo pesquisados ao longo das últimas décadas (LAVENS; SORGELOOS, 1996; STØTTRUP,

2003; OLIVOTTO et al., 2005). Entre os organismos mais promissores estão os copépodes, microcrustáceos com elevado conteúdo de ácidos graxos essenciais que fazem parte da dieta das larvas de diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural (SAMPLEY et al., 2007; BI et al, 2011). Outro alimento vivo que vem sendo considerado como alimento potencial e tem apresentado resultados positivos na larvicultura de peixes são os ciliados marinhos (NAGANO et al., 2000a; FIGUEIREDO et al, 2007; OLIVOTTO et al., 2010).

1.5 COPÉPODES

O nome copépode vêm do grego “kópe”, que significa remo e “podos” que significa pés, que são uma referência ao formato das pernas natatórias achadas, possuindo a aparência de remos (MAUCHLINE, 1998). Eles são microcrustáceos aquáticos, predominantemente marinhos, mas também podem ser encontrados em estuários e na água doce (STØTTRUP, 2003). Os copépodes estão entre os animais mais numerosos do planeta e são compostos por mais de 11.500 espécies divididas em cerca de 200 famílias (HUMES, 1994), agrupadas em 10 ordens. Porém apenas três delas apresentam interesse para a aquicultura, os calanoida, harpacticoida e cyclopoida (STØTTRUP, 2003).

No ambiente natural, os copépodes representam uma importante ligação entre o fitoplâncton e os níveis tróficos superiores na cadeia alimentar marinha (STØTTRUP, 2003), podendo representar até 80% da biomassa do mesozooplâncton (MAUCHLINE, 1998). Diversos trabalhos têm demonstrado que os náuplios de copépodes são fundamentais na cadeia alimentar de peixes marinhos no ambiente natural, sendo uma das presas mais importantes para as larvas desses animais, chegando a representar mais de 50% do conteúdo do trato digestório (KLEPPEL, et al., 2005; MUNK; CHENSNEY, 2005).

Dentro da produção aquícola, os copépodes são considerados como organismos muito promissores (CAMUS; ZENG, 2008; QIN, 2013), devido ao comportamento pelágico de diversas espécies, elevado valor nutricional, e pequeno tamanho naupliar (SAMPLEY et al., 2007; BI et al, 2011; DRILLET et al., 2011). Diversos estudos já demonstraram que o uso de copépodes como substituto ou suplemento ao rotífero e a artêmia pode promover o aumento da sobrevivência, do crescimento e melhorar a pigmentação natural para espécies marinhas de diversos grupos, entre eles a garoupa *Epinephelus coiodes* (TOLEDO et al., 1999), o linguado *Hippoglossus hippoglossus* (SHIELDS et al., 1999), o bacalhau *Gadus morhua* (HUNT von HERBING et al., 2001), o pargo *Lutjanus*

argetimaculatus (DOI et al., 1997), o atum *Thunnus thynnus* (YÚFERA et al., 2014) e os robalos *Lates calcarifer* e *Centropomus parallelus* (RAJKUMAR; KUMARAGURU VASAGAM, 2006; BARROSO et al., 2013), existindo na literatura um consenso sobre os benefícios dos copépodes (McEVOY *et al.* 1998; NANTON; CASTELL, 1999; TOLEDO et al., 1999; STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010; DRILLET et al., 2011; JENPSEN, 2014). Mesmo quando fornecidos em quantidades limitadas e em baixa concentrações, os copépodes resultaram em melhores índices zootécnicos para as larvas de diversas espécies (CONCEIÇÃO et al., 1997; TOLEDO et al., 1999; BARROSO et al., 2013). Alguns estudos demonstraram que também existe uma forte predileção por larvas de espécies marinhas sobre náuplios de copépodes em relação aos rotíferos (NELLEN et al., 1981; VAN der MERREN, 1991; EVJEMO et al., 2003). Buskey et al. (1993), Van der Merren (1991) e Jepsen (2014) sugerem que o padrão de locomoção dos náuplios de copépodes em “zig-zag” é mais atrativo para as larvas ativando uma forte resposta predatória.

Um dos principais atributos dos copépodes é a superioridade do seu valor nutricional. A maioria dos copépodes possuem grande quantidade de HUFAS (STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010), particularmente do DHA e do EPA (VAN der MEEREN et al., 2008). O nível de DHA em copépodes selvagens pode ser em até dez vezes superior aos níveis observados em metanáuplio de artêmia enriquecidos (McEVOY *et al.* 1998). Os copépodes ainda possuem a vantagem de apresentarem uma elevada proporção de fosfolípidios na composição dos seus ácidos graxos, inclusive na fração dos ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), em comparação com a artêmia, que possui elevada proporção de triacilgliceróis (VAN der MEEREN et al., 2008). Os fosfolípidios participam da formação das membranas celulares e possuem maior digestibilidade nas larvas de peixes, melhorando a biodisponibilidade e retenção dos HUFA's nos tecidos (SARGENT et al., 1997; IZQUIERDO et al., 2000). Os copépodes também possuem um elevado conteúdo proteico e de aminoácidos livres (VAN der MEEREN et al., 2008). A elevada proporção de aminoácidos livres é particularmente benéfica para larvas nos primeiros estágios de desenvolvimento e que possuem um trato digestório rudimentar, devido a sua melhor digestibilidade (RØNNESTAD; CONCEIÇÃO, 2005).

1.6 COPEÓPODES CALANOIDA

Os copépodes da ordem Calanoida são predominantemente pelágicos, ocorrendo em diversas profundidades (DUSSART; DEFAYE, 2001) e possuem grande importância nos ecossistemas marinhos servindo como alimento para as larvas de diversos organismos marinhos (MAUCHLINE, 1998). Entre os gêneros de calanoida mais estudados na aquicultura estão a *Acartia* sp., *Eurytemora* sp., *Gladioferens* sp., *Temora* sp., *Pseudocalanus* sp., *Parvocalanus* sp., *Pseudodiaptomus* sp. (MAUCHLINE, 1998; DRILLET et al., 2001; McKINON et al., 2003; RHYNE et al., 2010; CAROTENUTO et al., 2012; KLINE; LAIDLEY, 2015).

Segundo Sampey et al. (2007), entre as famílias de peixes especializadas no consumo de copépodes existe uma clara preferência por calanoidas, principalmente pelas espécies menores. Os copépodes calanoida são geralmente herbívoros, podendo distinguir e selecionar as partículas de alimento com base no tamanho e no paladar (HUNTLEY et al. 1986), sendo que algumas espécies, como a *Acartia tonsa*, conseguem alternar o modo de alimentação, passando de filtradores para predadores, consumindo ciliados, rotíferos e ovos de copépodes (MAUCHLINE, 1998).

Esse grupo de copépodes é considerado como um dos mais promissores para a larvicultura, devido ao pequeno tamanho dos náuplios (TURINGAN et al., 2005), o que é particularmente importante para a primeira alimentação das larvas de espécies tropicais; ao elevado valor nutricional (STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010); são animais pelágicos, se mantendo mais disponíveis a predação das larvas por estarem na coluna d'água (MAUCHLINE, 1998); estão entre as presas preferidas das larvas no meio ambiente (PAULY; CHRISTENSEN, 1995) e por serem relativamente abundantes em ambientes costeiros (MAUCHLINE, 1998).

1.7 *Bestiolina similis*

A espécie *Bestiolina similis* (SEWELL, 1914), antigo *Acrocalanus similis*, é um pequeno copépode calanoida pertencente à família Paracalanidae, com náuplios variando entre 59 e 99 μm (NI a NVI) (MCKINON et al., 2003), sendo particularmente comum em regiões costeiras e estuarinas, próximas aos trópicos (McKINNON; KLUMPP, 1998; McKINNON et al., 2003). Os copépodes da família Paracalanidae têm ganhado crescente interesse na aquicultura, sendo reportados como os copépodes calanoida que conseguem atingir maior

produtividade e alcançar as maiores densidades dentro da produção intensiva (McKINNON et al., 2003; KLINE; LANDLEY, 2015).

As espécies *Acrocalanus inermis* (SEWELL, 1912), *A. sinicus* (SHEN; LEE, 1966) e *A. similis* (SEWELL, 1914) foram retiradas do gênero *Acrocalanus* (GIESBRECHT, 1888) para criar o gênero *Bestiola* (ANDRONOV, 1972). Porém, como este nome já era utilizado por um gênero de inseto, foi substituído posteriormente por *Bestiolina* (ANDRONOV, 1991; MOON; LEE; SOH, 2010). O gênero *Bestiolina* sp. foi descrito no Brasil por Pereira (2004), Sterza e Fernandes (2006) e Sterza et al. (2008), sendo que a espécie *B. similis* foi identificada em 2010 por Pereira (2011), na região de Santos e Bertioga, no litoral do estado de São Paulo. Pereira (2011) observou a presença de *B. similis* durante todo o ano no canal de Santos e no canal da Bertioga (São Paulo, Brasil) em elevadas densidades, chegando a ser a espécie dominante do zooplâncton em coletas realizadas nos meses de maio e outubro. Mckinnon e Klumpp (1998) também observaram elevadas densidades de *B. similis* em coletas de campo no nordeste da Austrália.

O copépode *B. similis* possui náuplios com pequeno tamanho corporal, com cerca de 80 μm (McKINNON et al., 2003), o que pode ser considerado um atributo desejado para escolha do alimento vivo a ser utilizado na larvicultura (STØTTRUP, 2000), e possui uma elevada taxa de fecundidade, sendo observada a produção de até 54 ovos . fêmea⁻¹ . dia⁻¹ em laboratório (McKINNON et al., 2003; CAMUS; ZENG; McKINNON, 2009) e 55 ovos . fêmea⁻¹ . dia⁻¹ no ambiente natural (McKINNON; KLUMPP, 1998). A espécie libera os ovos diretamente na coluna d'água, geralmente em grupos de 4 ovos por vez, sendo que a produção de ovos pode ocorrer continuamente durante o período de 24 h (VANDERLUGT et al., 2009). Os ovos são pequenos, com aproximadamente 74 μm (McKINNON et al., 2003), e a eclosão pode ocorrer em um período inferior a 12 h (VANDERLUGT et al., 2009)

De acordo com os resultados do estudo de Mckinon et al. (2003) comparando diferentes espécies de copépodes tropicais, os autores indicam que *B. similis* possui grande potencial para a aquicultura com mais características desejáveis do que outros gêneros bastante estudados como a *Acartia* sp. A espécie *B. similis* também possui a vantagem de ser autóctone do litoral brasileiro o que é interessante do ponto de vista ambiental, por eliminar o risco potencial de introdução de espécies exóticas e do ponto de vista da produção aquícola, pois são utilizadas populações já adaptadas às condições locais.

1.8 DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DE COPÉPODES

Os copépodes calanoida apresentam três principais fases de desenvolvimento após a eclosão do ovo, passando por náuplios, copepoditos e adultos. A fase naupliar apresenta seis estágios de desenvolvimento (abreviados por NI - NVI), com exceção de algumas espécies dos gêneros *Labidocera* sp. e *Pseudodiaptomus* sp. (MAUCHLINE, 1998), sendo que grande parte das espécies só começam a se alimentar a partir do terceiro ou quarto estágio naupliar (NIII e NIV) (BERGREEN et al., 1988; STØTTRUP, 2003). A segunda etapa consiste na metamorfose de náuplios para copepoditos, em que os animais já apresentam características de adulto, com o desenvolvimento através de cinco (poucas espécies) ou seis estágios (CI a CVI), em que ocorre diferenciação dos apêndices e progressivo aumento na segmentação e no volume corporal. Os animais no último estágio de desenvolvimento (CVI) são considerados adultos (STØTTRUP, 2003).

O período de desenvolvimento em copépodes calanoida pode variar de alguns dias, como no caso de *A. sijiensis*; *A. tonsa*; *P. crassirostris*, até meses, como no caso de *Calanus marshallae*, e é diretamente dependente do tipo e quantidade do alimento e dos fatores ambientais, principalmente da temperatura (MAUCHLINE, 1998; STØTTRUP, 2003; RHYNE et al., 2010; DRILLET et al., 2011). As exigências energéticas também variam entre as espécies de copépodes, influenciando no crescimento e no desenvolvimento dos animais, sendo importante dessa forma definir a taxa de crescimento para cada espécie alvo (STØTTRUP, 2003; HOLSTE, 2010). A avaliação do período de desenvolvimento é um índice utilizado em diversos trabalhos de campo e em laboratório (CAMUS; ZENG, 2008; RHYNE et al., 2010; FERREIDOUNI; MESKAR; ASIL, 2015) e sua determinação pode auxiliar na previsão e no escalonamento da produção dos copépodes como alimento vivo.

A reprodução ocorre de forma sexuada e os copépodes podem liberar seus ovos diretamente na água ou armazená-los em sacos ovíferos (MAUCHLINE, 1998). A produção de ovos é mensurada com base na produção diária de ovos por fêmea, independentemente do método de reprodução e é um índice bastante utilizado para medir a produtividade e o potencial de crescimento da população de copépodes (STØTTRUP, 2003; CAMUS; ZENG, 2008). Esse índice também é utilizado em laboratórios de produção de organismos aquáticos para estimar o suprimento de náuplios produzidos para alimentação das larvas de peixes

(ALAJMI et al., 2014). Segundo Mauchline (1998) a fecundidade diária de um copépode calanoida pode variar de acordo com a espécie e também em função de fatores abióticos e nutricionais. Embora existam diferenças morfológicas entre os gêneros de copépodes calanoida, os machos e fêmeas podem ser identificados basicamente através da diferenciação da antênula; do quinto par de pernas (P5) nos machos, e do segmento genital no urossomo (MAUHLIN, 1998; STØTTRUP, 2003).

1.9 PRODUÇÃO DE COPÉPODES EM AMBIENTE CONTROLADO

A forma mais comum de utilização de copépodes na aquicultura têm sido através de coletas em viveiros (LIAO; SU; CHANG, 2001; STØTTRUP, 2003) ou no ambiente natural (TOLEDO et al., 1999; STØTTRUP, 2003). A produção extensiva é baseada na fertilização dos viveiros, gerando “blooms” de microalgas (CONCEIÇÃO et al., 2010) e muitas espécies de peixes já foram produzidas com base na criação extensiva de copépodes (TOLEDO et al., 1999; LIAO; SU; CHANG, 2001; STØTTRUP, 2003; OGLE et al., 2005; TOLEDO et al., 2005). Porém este método de produção de copépodes é altamente dependente das condições climáticas e meteorológicas (KNUCKEY et al., 2005) e apresenta o risco de introdução de parasitas e patógenos na larvicultura (SU et al., 2005; CONCEIÇÃO et al., 2010). De acordo com Su et al. (2005) já ocorreram mortalidades em massa na produção de garoupa devido a transmissão de vírus, como o VNN (Vírus da Necrose Neural), e de parasitas, entre eles o dinoflagelado *Amylodinium* sp., introduzidos na larvicultura junto com copépodes coletados. Além de representar grandes perdas na produção, a introdução desses organismos patogênicos é crítica para laboratórios de produção, pois muitos desses agentes, como as bactérias e vírus, se dispersam facilmente e são de difícil erradicação (BRIEDE, 2010).

Diversos estudos já demonstraram ser possível produzir copépodes em sistema intensivo, com ambiente controlado. Payne e Rippingale (2001) produziram o copépode *Gladioferens imparipes* utilizando tanques de 500 e 1000 L em sistema semicontínuo e sistema de recirculação, automatizado para o tratamento da água e coleta de náuplios, com produção média diária de 870 náuplios . L⁻¹ . dia⁻¹. Buttino et al., 2012 produziram os copépodes *Temora stylifera* e *Centropages typicus* em sistema de recirculação, em tanques de 500 L, com a produção máxima de 380 copépodes . L⁻¹. Porém o estudo que apresentou maior produção de náuplios foi o de Kline e Laidley (2015), em que os autores produziram

o copépode paralacalanóide *Parvocalanus crassirostris* em tanques de 1.500 L, com sistema de recirculação, observando a produção média diária de 18 milhões de náuplios por tanque.

Apesar das vantagens do sistema de produção intensiva, como a maior biossegurança e controle da produção, um dos principais problemas ainda é a dificuldade de obtenção de elevadas densidades e a baixa produtividade dos copépodes calanóide (STØTTRUP, 2003; McKINNON et al, 2003). Segundo STØTTRUP (2003) um dos obstáculos para utilização de copépodes em escala comercial na aquicultura é a falta de protocolos que otimizem a produção em massa, o que implica na necessidade de se definir condições ambientais e nutricionais ótimas para a manutenção dos animais, ocorrendo no aumento da produção e diminuição dos custos. Segundo Morehead (2004) a identificação de condições ótimas para a produção de espécies com potencial aquícola é um fator chave para o sucesso da atividade e a adequação dos parâmetros ambientais não apenas influencia no aumento da produtividade, mas também possui um grande impacto econômico.

Dentre os parâmetros ambientais, a temperatura é considerada como um dos fatores que mais influenciam na fisiologia e no ciclo de vida dos copépodes, regulando o crescimento e o potencial reprodutivo (CHINNERY; WILLIANS, 2004; HOLSTE; PECK, 2006; MILIONE; ZENG, 2008; RHYNE et al., 2010). A salinidade é outro parâmetro que também pode afetar na produtividade de copépodes tanto no ambiente natural como em cativeiro (OHS et al., 2010; RHYNE et al., 2010). Seus efeitos sobre o crescimento e a fecundidade de copépodes marinhos e estuarinos já foram verificados em diversos estudos (CHINNERY; WILLIANS, 2004; CHENG et al., 2006; HOLSTE; PECK, 2006; SOUZA SANTOS et al., 2006; MILIONE; ZENG, 2008; OHS et al., 2010). Parâmetros, como a temperatura e a salinidade, ainda podem ser utilizados como uma ferramenta para inibir o crescimento de agentes patogênicos e de organismos indesejáveis na produção (JEPSEN, 2014). Um terceiro parâmetro que também afeta o ciclo reprodutivo e migratório de copépodes marinhos (MAUCHLINE, 1998; NELSON et al., 2011), mas que ainda é pouco estudado, é o fotoperíodo. Alguns autores já demonstraram sua influência na taxa de produção de ovos (STEARNS et al., 1989; CERVETTO et al., 1993; CAMUS; ZENG 2008; MILIOU, 1992) e no desenvolvimento naupliar (CAMUS; ZENG, 2008; PECK, 2008; FEREDOUNI; MESKAR; ASIL, 2015).

1.10 IMPORTÂNCIA DOS CILIADOS

Além dos copépodes, outro grupo de animais que possuem importância na alimentação de larvas de peixes no ambiente natural e que recentemente tem despertado um maior interesse por parte dos pesquisadores para sua aplicação na aquicultura, são os protozoários ciliados. O filo Ciliophora é o maior grupo entre os protozoários e são importantes na transferência de nutrientes dentro da cadeia alimentar em ambientes costeiros, sendo a principal ligação no loop microbiano marinho (MONAGNES, DOWER; FIGUEIREDO, 2010). Os protozoários são uma fonte de alimento essencial para diversos copépodes marinhos (DUTZ; PETERS, 2008) e também possuem um papel importante na alimentação inicial de larvas de diferentes grupos taxonômicos (FUKAMI et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2007; MONTAGNES; DOWER; FIGUEIREDO, 2010).

Convencionalmente, os ciliados marinhos são divididos em dois principais grupos, loricados (tintínídeos) e aloricados (“ciliados nús”) (NAGANO et al., 2000). Quando comparados com outros tipos de zooplâncton, podemos ver que ainda existe pouca informação sobre a predação de ciliados por larvas de peixes no ambiente natural e em laboratório (FIGUEIREDO; NASH; MONTAGNES, 2007). Grande parte da informação existente ainda é referente aos tintínídeos, os quais possuem partes indigestíveis que podem ser identificadas mais facilmente no intestino das larvas (PIERCE; TURNER 1992). A predação dos ciliados aloricados pode ser ainda mais importante, devido à maior ocorrência geográfica e numérica desses ciliados em relação aos tintínídeos (KAMIYAMA et al., 2000). Porém este grupo de ciliados pode ser subestimados em estudos de dietas de larvas devido à dificuldade de identificação pela sua rápida digestão e transparência (FUKAMI et al., 1999; NAGANO et al., 2000). Nagano et al. (2000) não puderam observar o ciliado *Euplotes* sp. no intestino de larvas do peixe cirurgião *Paracanthus hepatus* utilizando técnicas convencionais de microscopia. A confirmação da ingestão dos ciliados só pôde ser feita com a utilização de técnicas de biofluorescência. Fukami et al. (1999) utilizando microscopia de fluorescência para investigar a predação de protozoários aloricados por larvas de peixes marinhos encontraram protistas no trato digestório de peixes de 42 grupos taxonômicos diferentes. De forma similar, Figueiredo et al. (2007) encontraram protozoários no trato digestório de larvas de peixes marinhos em todas as 12 espécies examinadas pelos autores. Considerando a rápida digestão dos protistas,

os autores estimaram que os protozários podem representar pelo menos 25 % da dieta de seis dessas espécies.

Alguns estudos de laboratório também já constataram que larvas de peixes marinhos podem se alimentar de diversas espécies de ciliados aloricados, como *Balanion* sp.; *Euplotes* sp. e *Strombidium* sp. (LESSARD et al. 1996; HUNT von HERBING; GALLAGER, 2000; NAGANO et al. 2000; FIGUEIREDO et al., 2007) e alguns autores sugerem que os protozoários podem ser a única presa adequada para suportar o crescimento e a sobrevivência inicial de larvas de peixe (NAGANO et al., 2000; HUNT von HERBING et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2007), particularmente em larvas com pequeno tamanho corporal, menores que 3 mm, as quais não conseguem ingerir náuplios de copépodes (IKEWAKI; TANAKA, 1993). Outros trabalhos avaliando a alimentação de larvas com ciliados também demonstram que larvas podem ingerir um grande número de protozoários, variando de 400 a 1500 ciliados . larva⁻¹ . h⁻¹ (OHMAN et al., 1991; LAIR et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 2007). No estudo de Fukami et al. (1999) os autores sugerem que as larvas de peixes predam os protistas de forma seletiva e não aleatoriamente. Com o recente reconhecimento da importância e do potencial dos protozoários na alimentação de larvas de peixes, deveria existir um maior foco e mais estudos para se investigar o uso de protozoários na larvicultura de peixes (FIGUEIREDO et al., 2007; MONTAGNES; DOWER; FIGUEIREDO, 2010)

1.11 *Euplotes* sp.

O ciliado aloricado *Euplotes* sp. possui pequenas dimensões, variando em média de 60 a 110 µm (NAGANO et al., 2000), e vem sendo utilizado experimentalmente na larvicultura de diversas espécies de peixes marinhos ao longo das últimas décadas, sendo observado em vários destes experimentos resultados positivos na sobrevivência das larvas. Madhu e Madhu (2010) observaram maior sobrevivência de larvas do “firefish” *Nemateleotris decora*, após o período de 35 dias, quando alimentadas com *Euplotes* sp. e *Brachionus rotundiformes* (sobrevivência de 66%) em comparação com dietas utilizando somente rotíferos *B. rotundiformis* e *Brachionus plicatilis* (sobrevivência de 10%) e dietas utilizando náuplios do copépode *Acartia tonsa* e *B. rotundiformes* (sobrevivência de 40%). Olivotto et al. (2005) também observaram maior sobrevivência no grupo de larvas do gobídeo *Gobiossoma evelynae* alimentadas com *Euplotes* sp. e *B. rotundiformis* (50%) em comparação ao grupo alimentado somente com rotíferos *B. rotundiformis* e *B.*

plicatilis (35%). Leu, Sune e Meng (2015) observaram maior sobrevivência para o peixe anjo *Chaetodonplus sptentrionalis* durante os primeiros 14 dias de larvicultura para larvas alimentadas somente com ciliado *Euplotes* sp., na densidade de 20 a 50 ciliados . mL⁻¹, em comparação aos tratamento com rotíferos e com copépodes harpacticoida. Larvas de garoupa *Epinephelus septemfasciatus*, e do peixe cirurgião *Paracanthurus hepatus*, também foram aptas a se alimentar de *Euplotes* sp. imediatamente após a absorção do saco vitelínico e apresentaram maior sobrevivência, em comparação com as larvas não alimentadas (NAGANO et al., 2000a; NAGANO et al., 2000b).

O ciliado *Euplotes* sp. possui bons níveis de ácidos graxos altamente insaturados, como DHA e EPA (ZHUKOVA; KHARLAMENKO, 1999; DRILLET; 2006; KRAUL, 2006). Os flagelados e ciliados são capazes de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (ZHUKOVA; KHARLAMENKO, 1999) e segundo Gallager et al. (1996) os protozoários possuem o potencial de aumentar a sobrevivência de larvas durante os primeiros estágios de desenvolvimento, devido a sua maior digestibilidade e elevado conteúdo de ácidos graxos ômega 3. Kraul (2006) ao analisar a composição de ácidos graxos em *Euplotes* sp. verificou que é possível enriquecer o ciliado com níveis moderados de ômega 3 utilizando enriquecedores comerciais.

Alguns autores consideram o ciliado *Euplotes* sp. como organismo potencial para utilização na aquicultura (MONAGNES, DOWER; FIGUEIREDO et al., 2010; OLIVOTTO et al., 2005; NAGANO et al., 2000a) devido ao seu pequeno tamanho (OLIVOTTO et al., 2005); alcançam elevadas densidades (UYE et al., 1996), não necessitam exclusivamente do uso de microalgas para sua manutenção em cativeiro (CÔRTEZ; TSUZUKI; MELO, 2013) e são encontrados e predados por larvas no ambiente natural (HOLT; HOLT, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

É indiscutível a necessidade de se produzir alimentos vivos de alta qualidade, otimizando a produção de peixes marinhos, principalmente quando consideramos espécies com grande demanda de mercado e elevado valor econômico. Apesar das diversas vantagens apresentadas pelos alimentos vivos tradicionalmente utilizados na aquicultura, estes não conseguem suportar de forma satisfatória o desenvolvimento de várias espécies de peixes marinhos de corte e ornamentais.

Entre os alimentos alternativos que vêm sendo estudados, destacam-se os copépodes, que são organismos com alto valor nutricional, possuem tamanhos e natação adequados para as larvas de peixes, e os protozoários marinhos, têm ganhado atenção, principalmente como suplementação alimentar de larvas com pequeno tamanho, durante os primeiros dias de larvicultura. Vários estudos têm demonstrando que o uso de copépodes e de ciliados podem proporcionar o aumento da sobrevivência, e no caso dos copépodes ainda pode ser observado maior crescimento e redução nas deformidades e na má pigmentação das larvas.

A tecnologia de produção de copépodes já é empregada em algumas regiões do mundo, porém várias dificuldades ainda são encontradas, principalmente quando comparamos com a produção de rotíferos e da artêmia. No caso dos ciliados marinhos existe uma grande lacuna de estudos focando a produção em massa desses organismos para utilização na aquicultura. Entre os principais obstáculos para produção de alimentos vivos alternativos em escala comercial está a dificuldade de identificação de espécies com características adequadas para a produção intensiva e a falta de protocolos para otimização da produção.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver protocolos de produção para alimentos vivos alternativos (copépode e ciliado), através da avaliação do efeito de parâmetros abióticos (temperatura; fotoperíodo e salinidade), sobre os índices zootécnicos do copépode *Bestiolina similis* e do ciliado *Euplotes* sp., em sistema intensivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o efeito da temperatura na produção do copépode *B. similis*, através das taxas de desenvolvimento; sobrevivência final; crescimento específico; crescimento populacional; período de duplicação da população; produção de ovos . fêmea⁻¹ . dia⁻¹ ; taxa de eclosão e da taxa de tolerância à variação abrupta da temperatura para náuplios e adultos.

b) Avaliar o efeito do fotoperíodo na produção do copépode *B. similis*, através das taxas de desenvolvimento; sobrevivência final; crescimento específico; crescimento populacional; período de duplicação da população; produção de ovos . fêmea⁻¹ . dia⁻¹ e taxa de eclosão.

c) Avaliar o efeito da salinidade na produção do copépode *B. similis*, através das taxas de desenvolvimento; sobrevivência final; crescimento específico; crescimento populacional; período de duplicação da população; produção de ovos . fêmea⁻¹ . dia⁻¹; taxa de eclosão e da taxa de tolerância à variação abrupta da salinidade para náuplios e adultos.

d) Avaliar o efeito da temperatura, da salinidade, do fotoperíodo, da taxa de aeração e de diferentes concentrações de alimento no crescimento populacional do protozoário ciliado *Euplotes* sp.

4 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese foi organizada em cinco capítulos, sendo o capítulo introdutório referente à revisão de literatura e os quatro capítulos seguintes correspondentes aos artigos científicos. Os capítulos II a V foram formatados conforme as normas da revista *Aquaculture* (A2, Fator de impacto: 1.878)

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO POPULACIONAL, PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPÉPODE *Bestiolina similis*.

Wesley Freitas da Anunciação^{a*}; Mônica Yumi Tsuzuki^a

^a Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Aquicultura, Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos, Servidão dos Coroas 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil

*wannunciacao@gmail.com

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista Aquaculture (A2, Fator de impacto: 1.878)

5 RESUMO

A produção de formas jovens ainda é um dos grandes gargalos da piscicultura marinha e um dos principais problemas são as elevadas taxas de mortalidade que ocorrem nas fases iniciais da larvicultura. Os copépodes constituem um importante componente dos ecossistemas marinhos e segundo diversos estudos o seu uso na alimentação de larvas de várias espécies resultou em um aumento no crescimento, sobrevivência e na diminuição de deformidades. Apesar das vantagens do uso de copépodes na aquicultura, ainda existem algumas limitações à sua produção, sendo necessário otimizar as técnicas de produção afim de se maximizar a produtividade. A investigação de fatores abióticos como a temperatura é importante pois pode influenciar no crescimento, sobrevivência e na fecundidade dos copépodes. Para avaliar a influência da temperatura na produção do copépe *Bestiolina similis* foram realizados diferentes experimentos avaliando a tolerância à variação abrupta da temperatura, dinâmica populacional, capacidade reprodutiva e período de desenvolvimento, com a utilização de diferentes tratamentos, correspondentes a seis temperaturas, 22; 24; 26; 28; 30 e 32 °C. A temperatura afetou o crescimento populacional, sobrevivência e fecundidade. Através dos resultados observados no presente estudo foi verificado que a faixa entre 24 e 32 °C é adequada para produção da espécie, proporcionando elevada taxa de crescimento, fecundidade, sobrevivência e menor período de desenvolvimento.

Palavras-chave: Calanoida; Produção de ovos; Alimento vivo; Aquicultura.

6 ABSTRACT

The fish seeds production still is one of the major bottlenecks of marine fish farming and one of the main problems is the high mortality rate that occur in the early stages of larvae development. The copepods are an important component of marine ecosystems and several studies have shown that its use for larval feed resulted in a growth increase, better survival and decreased deformities. Despite the advantages of the use of copepods in aquaculture, there are still some limitations to its production, being necessary to optimize production techniques in order to maximize the productivity. The investigation of abiotic factors such as temperature is important because it can influence the growth, survival and fecundity of copepods. To evaluate the effect of temperature on the production of *Bestiolina similis* copepod we conducted different experiments to evaluate the tolerance to abrupt temperature variation, population dynamics, reproductive capacity and development, using different treatments, corresponding to six different temperatures, 22; 24; 26; 28; 30 and 32 ° C. We note that the temperature affected the population growth, development, survival and fecundity. Based on the observed results in the present study we found that the range between 24 and 32 ° C is suitable to produce this copepod, providing high growth rate, fertility, survival and lower development time.

Keywords: Calanoida; Egg production; Live feed; Aquaculture.

7 INTRODUÇÃO

A produção de juvenis ainda é um dos grandes gargalos da piscicultura marinha, sendo observadas elevadas taxas de mortalidade nas fases iniciais da larvicultura, sendo que a inadequação do alimento é um dos principais responsáveis pela baixa sobrevivência e pela elevada taxa de deformidade nos peixes (LUBZENS et al., 1997; RAJKUMAR; KUMARAGURU VASAGAM, 2006). Os rotíferos (*Brachionus* sp.) e a artêmia (*Artemia* sp.) são os alimentos vivos tradicionalmente utilizados na aquicultura e possuem diversas características favoráveis à sua produção. Porém, devido ao seu padrão de natação, tamanho e perfil nutricional, ambos não são adequados para a alimentação de larvas de diversas espécies de peixes marinhos com importância comercial, como algumas espécies de garoupas, *Epinephelus coioides*, *E. tauvina* (DOI et al., 1997; TOLEDO et al., 1999), pargos, *Lutjanus campechanus*, *L. argentimaculatus* (SCHIPP et al., 1999; OGLE et al., 2005) e linguado, *Hippoglossus hippoglossus* (SHIELDS et al., 1999; BELL et al., 2003). Devido a este fato, o uso de alimentos alternativos, como os copépodes, vem ganhando cada vez mais importância (STØTTRUP, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2010).

Os copépodes são microcrustáceos aquáticos que constituem um importante componente de ecossistemas marinhos como consumidores do fitoplâncton e servindo como alimento para espécies de níveis tróficos superiores (MAUCLINE, 1998). Copépodes são presas naturais de larvas de um grande número de espécies de peixes marinhos (TOLEDO et al., 1999; SAMPEY et al., 2007) e em diversos estudos, a alimentação exclusivamente com copépodes, ou quando combinados com outros organismos, já demonstrou resultados positivos, com o aumento do crescimento, sobrevivência e da resistência das larvas (SHIELDS et al., 1999; TOLEDO et al. 1999; LIAO; SU; CHANG, 2001; PAYNE et al., 2001; SU et al. 2005; OGLE et al. 2005; OLIVOTTO et al., 2008; DRILLET et al, 2011; BARROSO et al., 2013; SARAVANAN et al., 2013; ØIE et al., 2015).

A família Paracalanidae é composta por pequenos copépodes que possuem ampla distribuição (McKINNON; DUGGAN, 2001; McKINNON et al., 2003), sendo um dos principais constituintes de comunidades planctônicas nos trópicos (McKINNON; KLUMPP, 1997; McKINNON et al., 2003). A espécie *Bestiolina similis* é um copépode paracalanóide que pode ser observado em elevadas densidades no ambiente natural e é uma das presas favoritas para larvas de diversas espécies de peixes (McKINNON et al., 2003; SAMPEY et al. 2007).

Segundo McKinon et al. (2003) a espécie apresenta características favoráveis ao seu uso na aquicultura, como pequeno tamanho (náuplios com cerca de 70 μm) e perfil nutricional adequado.

Apesar das diversas vantagens do uso de copépodes na aquicultura, ainda existem limitações, como a dificuldade de produção contínua em escala comercial (PAYNE; RIPPINGALE, 2001; STØTTRUP, 2003) e a obtenção de elevadas densidades dentro de sistemas intensivos (STØTTRUP, 2003). Fatores abióticos podem afetar a produtividade de copépodes, influenciando em diversos aspectos reprodutivos e no desenvolvimento dos animais (DUSSART; DEFAYE, 2001; PETERSON, 2001; HALL; BURNS, 2002; CHINNERY; WILLIAMS, 2004; HOLSTE; PECK, 2006)). A temperatura tem sido positivamente relacionada com a taxa de desenvolvimento (CHINNERY; WILLIAMS, 2004; RHYNE et al., 2010) e a taxa de produção de ovos (MAUCHLINE, 1998; MILIONE; ZENG, 2008), sendo considerada como um dos fatores que mais influenciam na fisiologia e no ciclo de vida dos copépodes (BONNET et al., 2007).

Foram conduzidos diversos experimentos para avaliar o efeito da temperatura sobre os estágios de desenvolvimento, proporção sexual, sobrevivência, crescimento populacional, fecundidade e taxa de eclosão de ovos de *B. similis*, com o objetivo de definir a faixa de temperatura mais adequada para produção deste copépode na aquicultura.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS COPÉPODES

Os animais utilizados no presente estudo foram coletados durante na Lagoa da Conceição; Florianópolis; SC, com o uso de rede de plâncton, malha de 300 μm . Os animais coletados foram separados com o auxílio de peneiras de diferentes malhas (500, 300 e 150 μm), isolados no microscópio estereoscópico e transferidos para tanques cilíndricos de 150 L mantidos em sistema semi-estático, com coletor automatizado (para ovos e náuplios) e fracionador de proteínas. Os copépodes eram alimentados com as microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* (1:1) na concentração de 1,0 a 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹ (STØTTRUP, 2003).

Os parâmetros físico-químicos foram mantidos em valores semelhantes aos mensurados no momento da coleta (salinidade de 30 g . L⁻¹, temperatura de 24 \pm 2 °C e pH 8.3). Para a manutenção da qualidade

da água era realizada a renovação de 100% do volume dos tanques a cada 15 dias. A água utilizada na manutenção dos copépodes e nos experimentos realizados, passava por duas fases de filtragem, compostas por um filtro mecânico (50 μm), fracionador de proteínas e por tratamento ultravioleta (32w). Após a filtragem era realizada a desinfecção da água com o uso de peróxido de hidrogênio 28 %. A água doce utilizada para as diluições da água marinha passava por um filtro deionizador de 4 estágios.

A identificação da espécie foi realizada pelo departamento de taxonomia do Instituto Oceanográfico de São Paulo (IO-SP) e pelo departamento de taxonomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em laboratório por mais de 20 gerações antes de serem utilizados nos experimentos.

8.2 DESENHO EXPERIMENTAL

8.3 EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA TEMPERATURA

Náuplios e adultos de copépodes oriundos de um dos tanques de produção, mantido em $26 \pm 0,6$ °C, foram expostos a nove diferentes temperaturas, 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30; 32 e 34 °C, durante o período de 24 h. Foram realizados dois testes, o primeiro para avaliar a tolerância de náuplios e o segundo para avaliar a tolerância de adultos à variação abrupta da temperatura. Em cada unidade experimental de 500 mL foram estocados $500 \pm 31,42$ náuplios, no primeiro teste, e $100 \pm 15,26$ adultos de *B. similis*, no segundo.

Os animais (previamente separados do tanque de produção) foram coletados de acordo com volumes predeterminados através da quantificação volumétrica, concentrados em peneira com malha de 45 μm e transferidos para as unidades experimentais (em triplicata) sem aclimação prévia. Ao final do período experimental, 50 % dos animais foram separados para a determinação da sobrevivência final, através da contagem do número total de animais vivos e mortos. O fotoperíodo foi mantido em 12L : 12E e a salinidade em 30 g . L⁻¹, durante todo o experimento.

8.4 ACLIMATAÇÃO DOS COPÉPODES ÀS DIFERENTES TEMPERATURAS

Para a realização dos experimentos de dinâmica populacional (experimento 2, item 8.5); período de desenvolvimento (experimento 3, item 8.6) e fecundidade (experimento 4, item 8.7), foi feita a aclimação prévia dos copépodes nas diferentes temperaturas avaliadas. Para realizar

este processo, todo o conteúdo de um dos tanques de produção foi concentrado em peneiras com tela de 105 e 60 μm , para separação dos náuplios, os quais foram transferidos para 6 tanques de aclimação, com 30 L de água marinha, salinidade 30 g . L⁻¹.

Estes tanques foram mantidos inicialmente com temperatura de 26 °C, controlada com o uso de aquecedores termostatos, em ambiente com temperatura controlada. O processo de aclimação dos animais foi realizado com o aumento ou a diminuição gradual de no máximo 3 °C ao dia, até a obtenção das temperaturas testadas, 22; 24; 26; 28; 30 e 32 °C. Os animais foram mantidos nestas condições por duas gerações antes de serem utilizados nos experimentos. Esse procedimento foi realizado para cada um dos experimentos executados.

8.5 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a dinâmica populacional do copépode *B. similis*, foram estocados 12 adultos, sendo 8 fêmeas e 4 machos, em recipientes contendo 750 mL de água marinha (30 g . L⁻¹). As unidades experimentais, mantidas em triplicata, eram fechadas com tampa, para evitar a variação da salinidade devido à evaporação, e ficavam em banho maria, dentro de seis caixas plásticas (uma por tratamento). Essas caixas foram mantidas em sala com temperatura controlada e possuíam um termostato aquecedor de 300w cada. Os tratamentos utilizados correspondiam a 6 diferentes temperaturas, 22 (T₂₂); 24 (T₂₄); 26 (T₂₆); 28 (T₂₈); 30 (T₃₀) e 32 (T₃₂).

Os animais foram alimentados uma vez ao dia com a microalga *Isocrysis galbana* na concentração média de 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹. A cada 3 dias foi realizada a renovação de 25 % da água através do sifonamento dos recipientes, com o auxílio de peneira com malha de 45 μm , para evitar a remoção dos náuplios. Durante o processo de alimentação e de renovação da água era realizado o ajuste da salinidade, caso necessário. Ao término do período experimental de onze dias, todo o conteúdo das unidades experimentais foi concentrado e fixado em formalina 5%, para a contagem e avaliação dos estágios de desenvolvimento e para determinação da proporção sexual. A taxa de crescimento específico populacional (K) foi calculada segundo a fórmula (LAMPERT; SOMMER, 1997; CAMUS; ZENG;McKINON, 2009):

$$K = \frac{\ln(N_0/N_T)}{T}$$

Onde T é o tempo de duração do experimento (em dias), N_T é a população ao final do experimento e N₀ a densidade inicial de estocagem

dos copépodes, sendo que o número de ovos observados foi desconsiderado nos cálculos realizados. Também foi calculado o tempo de duplicação da população (T_D) dividindo-se o \log_2 pela taxa de crescimento específico da população (K) (JAMES; AL-KHARS, 1986; LAMPERT; SOMMER, 1997):

$$T_D = \frac{\log_2 2}{K}$$

8.6 EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Para a avaliação do período de desenvolvimento do copépode *B. similis* nas diferentes temperaturas, foram utilizados recipientes cilíndricos com 500 mL de água marinha, 30 g . L⁻¹, tampados e dotados de leve aeração. As unidades experimentais foram mantidas em sala com temperatura controlada e fotoperíodo 12L : 12E. A temperatura nos diferentes tratamentos foi controlada com o uso de aquecedores termostatos de 300W, de acordo com as temperaturas avaliadas, 22 (T₂₂); 24 (T₂₄); 26 (T₂₆); 28 (T₂₈); 30 (T₃₀) e 32 (T₃₂).

Para a estocagem dos animais, foram separados todos os ovos produzidos nos tanques de aclimação e transferidos para recipientes plásticos de 20 L, um para cada tratamento. Após período médio de incubação de 24 h, os náuplios recém eclodidos foram contabilizados, através da contagem de 10 alíquotas de 25 mL, e estocados nas unidades experimentais, na densidade de 800 náuplios . L⁻¹. A microalga *Isochrysis galbana* foi utilizada para alimentação diária dos animais na concentração média de 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹ (STØTTRUP, 2003)

Os parâmetros de qualidade da água, amônia total (teste colorimétrico API®) e pH (teste colorimétrico API®), foram monitorados a cada 72h, enquanto a salinidade (refratômetro, com precisão de 1 g . L⁻¹) e a temperatura (termômetro de mercúrio, com precisão de 0,1 °C) foram monitoradas três vezes ao dia, às 8, 14 e 18h. A renovação de 20 % da água nas unidades experimentais foi realizada diariamente, com o auxílio de peneira com malha de 45µm, para se evitar a remoção de náuplios, sendo que água utilizada na renovação das unidades experimentais também era mantida em banho maria nas diferentes temperaturas avaliadas. Durante esse processo também era feita a correção da salinidade, caso houvesse a variação de mais de 1 g . L⁻¹.

Para a determinação dos estágios de desenvolvimento eram retiradas diariamente três alíquotas de 40 mL de cada unidade

experimental, após a homogeneização do conteúdo. Essas amostras foram analisadas no microscópio estereoscópio para se calcular a taxa de desenvolvimento diário, que consiste na porcentagem diária observada para cada estágio de desenvolvimento (náuplios, copepoditos e adultos). Ao se detectar que a totalidade da população de um determinado tratamento houvesse atingido o estágio de adultos, todo o conteúdo das unidades experimentais, daquele tratamento, era concentrado e fixados em formalina 5%, para posterior contagem e determinação da sobrevivência final.

8.7 EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO

Para se determinar o efeito da temperatura na produção de ovos do copépode *B. similis* foi realizado um experimento de quatro dias (VANDERLUGT; LENZS, 2008) em que foram estocados em cada unidade experimental seis indivíduos adultos, sendo 4 fêmeas e 2 machos, separados manualmente com auxílio de microscópio estereoscópio.

As unidades experimentais eram compostas de dois recipientes de 180 mL sobrepostos. A base do recipiente interno foi removida e substituída por uma malha de 120 μm , para permitir a retenção dos adultos e passagem dos ovos, que se acumulavam no fundo do recipiente externo. Diariamente os adultos eram removidos, junto com o recipiente interno, para serem estocados em um novo recipiente externo, mantido nas mesmas condições de temperatura e salinidade (esquema ilustrado no item 42 – Apêndice). Os animais adultos eram contabilizados durante esse processo e caso fosse detectada alguma mortalidade, era feita a reposição por outro indivíduo mantido nas mesmas condições experimentais, com mesma idade e sexo (adaptado de CAMUS; ZENG; MCKINON, 2009).

As unidades experimentais foram mantidas em banho maria, dentro de 6 caixas plásticas (uma por tratamento), com temperatura controlada através do uso de termostato aquecedor, previamente calibrados de acordo com as temperaturas avaliadas, 22 (T_{22}); 24 (T_{24}); 26 (T_{26}); 28 (T_{28}); 30 (T_{30}) e 32 (T_{32}). O experimento foi realizado em sala com temperatura controlada e fotoperíodo 12L : 12E. Os animais foram alimentados com a microalga *Isochrysis galbana* na concentração média de $1,0 \cdot 10^5$ células . mL^{-1} .

Os ovos e náuplios produzidos diariamente em cada unidade experimental eram concentrados em peneira com malha de 45 μm e separados em placas de Petri para a contagem com o auxílio de microscópio estereoscópio. A contagem foi utilizada para o cálculo da taxa de produção de ovos . fêmea . dia⁻¹. (T_P Fêmea):

$$T_{P \text{ Fêmea}} = \frac{N^{\circ} \text{ total ovos}}{N^{\circ} \text{ total de fêmeas}}$$

Após a contagem, cerca de 50 ovos de cada repetição eram transferidos para recipientes cilíndricos de 100 mL com água nas mesmas condições observadas dentro das unidades experimentais. O fotoperíodo foi o único parâmetro alterado, passando a ser de 24L : 0E. Após o período de 24 h, o conteúdo dos recipientes foi concentrado e transferido para placas de Petri, para ser analisado sob o microscópio estereoscópio. O número observado de náuplios recém eclodidos e de ovos que não eclodiram foi utilizado para determinação da taxa de eclosão ($T_{x \text{ Eclosão}}$).

$$T_{x \text{ Eclosão}} = \frac{(N^{\circ} \text{ ovos produzidos} - N^{\circ} \text{ ovos não eclodidos}) \cdot 100}{N^{\circ} \text{ ovos produzidos}}$$

8.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da taxa de crescimento específico, tempo de duplicação da população, proporção sexual, crescimento populacional, taxa de fecundidade e taxa de eclosão foram submetidos à Análise de Variância Unifatorial (ANOVA), com médias comparadas pelo teste Tukey, com nível de significância de 5 %, utilizando o software Statsoft Statistica 10 ®. As taxas, em porcentagem, foram transformadas através da raiz arco-seno. Os dados dos experimentos de variação abrupta da temperatura e de desenvolvimento foram submetidos a análise de regressão não linear e ao uso de ANOVA, para comparação das médias, com nível de significância de 5%. A normalidade da distribuição das amostras foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedacidade dos dados foi avaliada pelo teste de Levene.

9 RESULTADOS

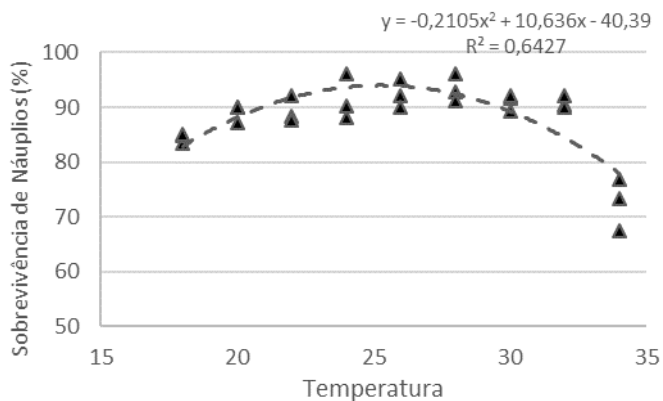
9.1 EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA TEMPERATURA

Náuplios e adultos demonstraram ser resistentes à variação abrupta para uma ampla faixa de temperatura, conforme pode ser observado na Figura 1A e 1B. Os animais apresentaram sobrevivência média superior a 65 e 50 % para náuplios e adultos, respectivamente, sendo os maiores índices de mortalidade observados quando ambos foram expostos a 34 °C (T_{34}). Considerando que os animais eram provenientes de um tanque com temperatura de 26°C (controle), foi possível verificar

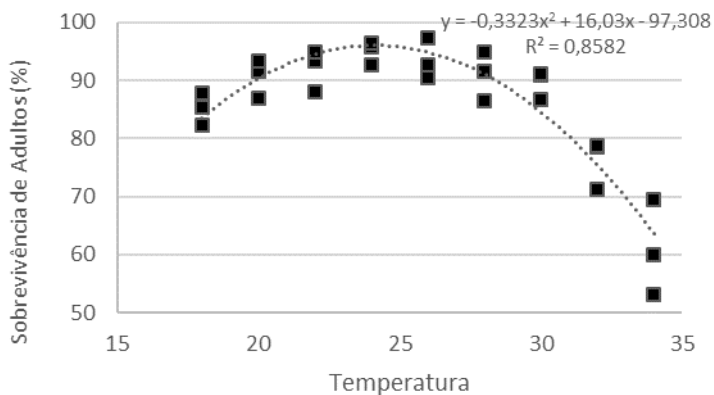
que a elevação da temperatura teve um impacto negativo mais acentuado na sobrevivência.

Figura 1. Curva de sobrevivência (24h) de náuplios (A) e adultos (B) de *B. similis* expostos à variação abrupta da temperatura.

A)



B)



9.2 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL

A temperatura influenciou significativamente ($p < 0,05$) na composição e na taxa de crescimento da população de *B. similis*, Tabela

1 e Figura 2A. Foi possível observar que na temperatura mais baixa (22 °C) ocorreu um menor número de adultos na população final ($p < 0,05$), quando comparado com os demais tratamentos. O número de náuplios, copepoditos e o tamanho da população total, também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes temperaturas.

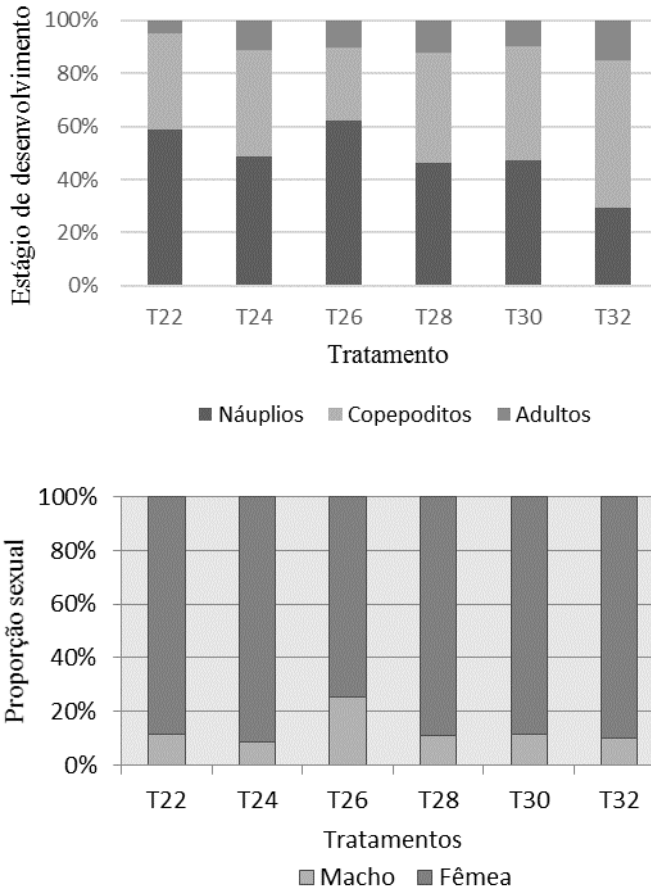
A taxa de crescimento específico (K) e o tempo de duplicação da população apresentaram melhores resultados no intervalo de 24 a 30°C quando comparamos com as temperaturas extremas de 22 e 32 ° C. Também foi observado o predomínio de fêmeas na população em todos os tratamentos, com variação entre 75,9 (T₂₆) a 92,2 % (T₂₄), não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), Figura 2B. Ao final do experimento os níveis de amônia tóxica se mantiveram entre 0,009 e 0,0017 mg . L⁻¹.

Tabela 1

Média (n=3) e desvio padrão da população total, dos diferentes estágios de desenvolvimento (náuplios, copepoditos, adultos para seis diferentes temperaturas, após dez dias. Densidade inicial de estocagem de 12 copépodes, 8 fêmeas e 4 machos. K é a taxa de crescimento específico e T_D é o tempo de duplicação da população (dias). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey (p<0,05).

| Tratamento | Náuplios | Copepoditos | Adultos | Total | K | T _D |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| T ₂₂ | 358,60±47,38 ^{ab} | 220,00±20,71 ^a | 28,60±11,35 ^a | 628,60±26,07 ^a | 0,395±0,00 ^a | 1,759±0,02 ^a |
| T ₂₄ | 466,00±121,95 ^{ab} | 386,60±81,90 ^b | 107,60±44,67 ^b | 978,00±112,69 ^b | 0,439±0,00 ^b | 1,576±0,04 ^b |
| T ₂₆ | 584,6,00±116,41 ^a | 260,00±54,26 ^{ac} | 95,30±12,33 ^b | 978,60±,175,86 ^b | 0,438±0,01 ^b | 1,580±0,08 ^b |
| T ₂₈ | 364,00±113,33 ^{ab} | 329,00±44,82 ^{abc} | 96,60±7,37 ^b | 814,00±138,68 ^{ab} | 0,421±0,01 ^b | 1,643±0,10 ^b |
| T ₃₀ | 416,00±163,15 ^{ab} | 378,00±51,59 ^{bc} | 86,60±18,41 ^b | 888,00±125,507 ^{ab} | 0,429±0,00 ^b | 1,613±0,06 ^b |
| T ₃₂ | 216,00±107,19 ^b | 407,30±44,06 ^b | 112,00±18,39 ^b | 757,30±69,03 ^{ab} | 0,414±0,00 ^a | 1,673±0,04 ^a |

Figura 2 - Média (n=3) dos diferentes estágios de desenvolvimento (náuplios, copepoditos, adultos) na composição da populacional (A) e na proporção sexual de adultos (B) de *B. similis* após o período de 10 dias.



9.3 EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

A velocidade de desenvolvimento dos diferentes estágios de maturação do copépode *B. similis* foi afetada pela temperatura conforme pode ser verificado na Figura 3 e na Tabela 2. Foi possível observar que o decréscimo da temperatura prolongou a duração dos estágios de desenvolvimento. O número de náuplios declinou de forma gradual no T₂₂ e no T₂₄, a partir do terceiro dia, enquanto nos demais tratamentos

houve uma queda acentuada, no terceiro e quarto dias. Os copepoditos foram observados a partir do terceiro (T_{24} ; T_{26} ; T_{28} ; T_{30} e T_{32}) e quarto dia (T_{22}), sendo que sua presença durou entre três (T_{28} ; T_{30} e T_{32}) e sete dias (T_{22}). A população chegou a maturidade completa, entre o oitavo (T_{28} ; T_{30} e T_{32}) e o décimo terceiro dia (T_{22}), Figura 3.

Figura 3 - Curvas do desenvolvimento de náuplios (■), copepoditos (◆) e adultos (▲) de *B. similis*, para seis temperaturas avaliadas durante o período de 13 dias (n=3).

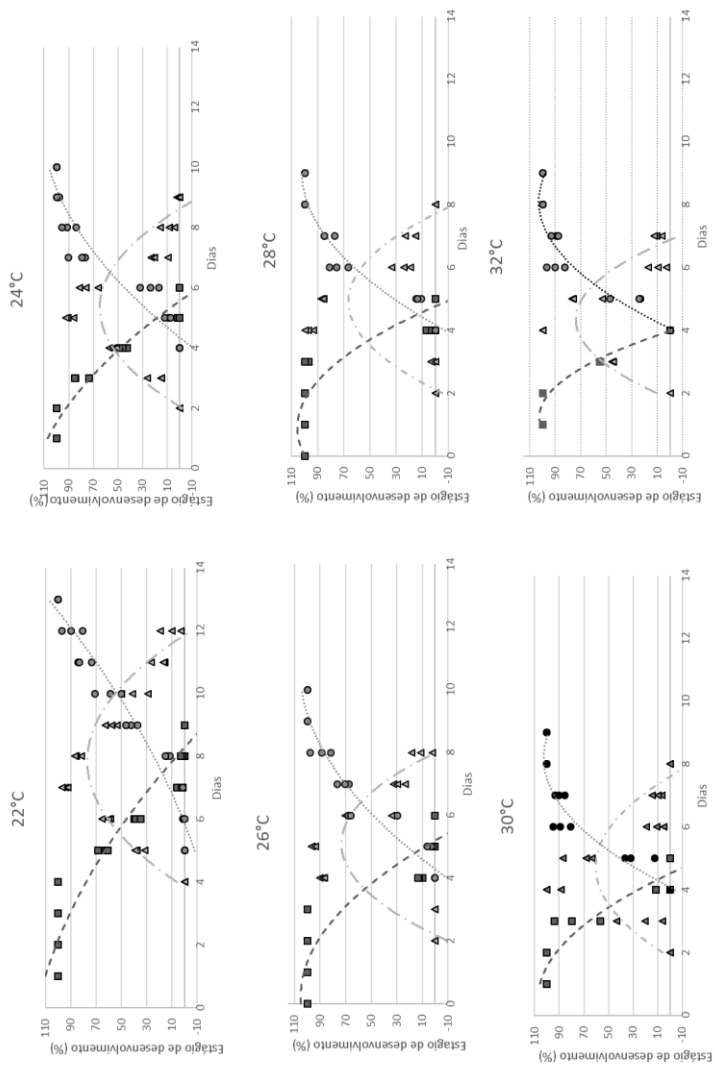


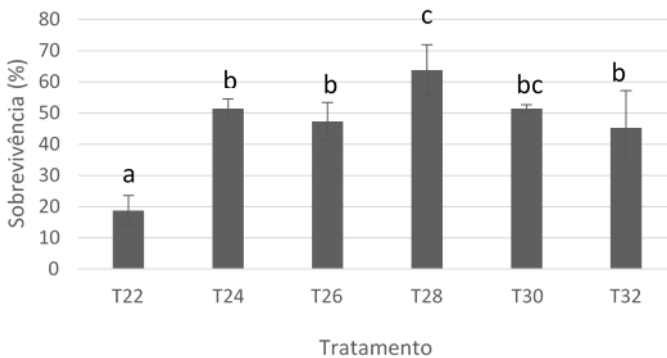
Tabela 2

Equações das curvas dos diferentes estágios de desenvolvimento do copépode *B. similis* e coeficiente de correlação, para as diferentes temperaturas avaliadas.

| Tratamento | Estágio | Equação | R ² |
|------------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 22°C | náuplios | $y = -1,0127x^2 - 5,7219x + 116,96$ | 0,903 |
| | copepoditos | $y = -5,094x^2 + 79,376x - 231,12$ | 0,854 |
| | adultos | $y = 0,7366x^2 + 1,2139x - 32,418$ | 0,950 |
| 24°C | náuplios | $y = 2,1956x^2 - 37,02x + 152,27$ | 0,909 |
| | copepoditos | $y = -8,5421x^2 + 87,398x - 152,21$ | 0,769 |
| | adultos | $y = -2,26x^2 + 50,361x - 175,92$ | 0,928 |
| 26°C | náuplios | $y = -8,6138x^2 + 19,2x + 97,228$ | 0,833 |
| | Copepoditos | $y = -11,23x^2 + 96,034x - 127,22$ | 0,620 |
| | Adultos | $y = -2,3249x^2 + 41,721x - 82,008$ | 0,936 |
| 28°C | Náuplios | $y = 6,9045x^2 - 84,904x + 255,77$ | 0,844 |
| | Copepoditos | $y = -11,991x^2 + 112,16x - 188,91$ | 0,620 |
| | Adultos | $y = -1,3147x^2 + 31,01x - 78,799$ | 0,886 |
| 30°C | Náuplios | $y = 1,7153x^2 - 31,807x + 136,16$ | 0,842 |
| | Copepoditos | $y = -7,322x^2 + 69,272x - 103,4$ | 0,537 |
| | Adultos | $y = -5,9884x^2 + 98,086x - 300,22$ | 0,93 |
| 32°C | Náuplios | $y = 1,7163x^2 - 31,319x + 130,8$ | 0,760 |
| | Copepoditos | $y = -28,389x^2 + 241,81x - 421,86$ | 0,893 |
| | Adultos | $y = -2,1591x^2 + 40,55x - 82,96$ | 0,900 |

A menor temperatura a que os copépodes foram expostos (22 °C) exerceu uma influência negativa ($p < 0,05$) na sobrevivência final de *B. similis* (Figura 4), sendo que a sobrevivência em T₂₂ ($18,80 \pm 4,17$ %) foi inferior ($p < 0,05$) à dos demais tratamentos, que variaram entre 45,23 e 63,80 %.

Figura 4 - Sobrevivência final de *B. similis* (Média \pm desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).



9.4 EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE TAXA DE ECLOSÃO

A temperatura influenciou na produção diária de ovos e na fecundidade total acumulada de fêmeas de *B. similis*, Tabela 3. Os animais expostos às temperaturas mais elevadas apresentaram maior fecundidade, sendo observada a quantidade máxima de ovos produzidos por fêmea \cdot dia⁻¹ de $47,58 \pm 6,25$ ovos, na temperatura de 32 °C. O maior valor para a fecundidade total acumulada durante o período de 4 dias também foi observado no T₃₂, com $156,6 \pm 20,59$ ovos \cdot fêmea⁻¹ ($p < 0,05$). A temperatura de 22 °C influenciou negativamente na fecundidade, gerando uma produção total de ovos inferior ($p < 0,05$) à dos demais tratamentos.

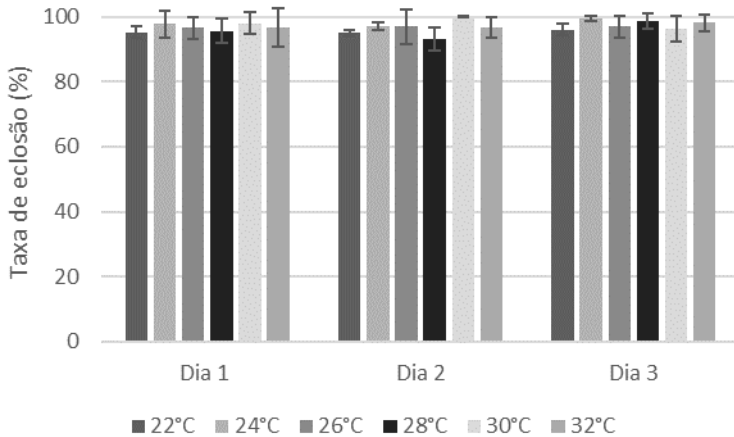
Ao contrário da fecundidade, a temperatura não apresentou influência na taxa de eclosão de ovos ($p > 0,05$) durante os três dias de experimento, Figura 5. A taxa de eclosão se manteve elevada, acima de 90% de eclosão, durante todo o período experimental.

Tabela 3

Média (n=4) e desvio padrão da fecundidade média diária por fêmea, durante o período de 4 dias, e fecundidade total acumulada por fêmea. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

| Temp. | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Total |
|-------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 22°C | 12,08±2,42 ^a | 18,6±0,62 ^a | 19,16±4,04 ^a | 20,00±7,12 ^a | 69,91±14,17 ^a |
| 24°C | 20,83±4,78 ^{ab} | 25,25±3,5 ^b | 23,3±4,04 ^a | 29,58±7,13 ^b | 99,00±7,11 ^b |
| 26°C | 28,00±3,50 ^{bc} | 30,00±6,06 ^b | 16,83±3,44 ^a | 30,66±7,14 ^b | 105,5±11,94 ^b |
| 28°C | 26,41±5,62 ^b | 32,25±1,95 ^b | 26,08±2,75 ^a | 35,91±7,15 ^{bc} | 120,66±16,25 ^b |
| 30°C | 36,25±6,48 ^c | 18,66±3,82 ^a | 22,08±3,98 ^a | 30,16±7,16 ^b | 107,16±7,47 ^b |
| 32°C | 34,75±6,54 ^{bc} | 47,58±6,25 ^c | 29,5±8,75 ^a | 44,83±7,17 ^c | 156,6±20,59 ^c |

Figura 5 - Média (n=3) e desvio padrão da taxa de eclosão de ovos de *B. similis* durante o período de 3 dias



10 DISCUSSÃO

A temperatura pode afetar a distribuição espacial e sazonal de copépodes marinhos na natureza (MILLER; MARCUS, 1994; DRIRA et al., 2014) além de ser um dos fatores ambientais que mais influenciam na produtividade desses crustáceos (RHYNE et al., 2009; STØTTRUP, 2003), afetando diretamente na produção de ovos e no desenvolvimento naupliar (MAUCLINE, 1998, DUSSART; DEFAYE, 2001). Os resultados observados no presente estudo demonstram que a temperatura exerceu influência no crescimento populacional, no tempo de desenvolvimento, na sobrevivência e na reprodução do copépode *B. similis*.

A espécie demonstrou ser resistente à variação abrupta da temperatura, dentro do intervalo de até 8 °C, com taxa de sobrevivência média superior a 65%, para náuplios, e 55%, para adultos. Essa tolerância pode estar relacionada ao fato de *B. similis* habitar em regiões estuarinas (MCKINNON; KLUMPP, 1997) onde ocorre maior flutuação para parâmetros como salinidade e temperatura. Diversas espécies de copépodes que vivem nesses ambientes possuem maior tolerância à variação da temperatura e da salinidade (GAUDY et al., 2000; CASTRO-LONGORIA, 2003; CHINNERY; WILLIAMS, 2004).

A temperatura também influenciou na dinâmica populacional de *B. similis*, afetando a taxa de crescimento e a composição da população.

A população final observada no presente estudo chegou a apresentar um aumento superior a 60 vezes o tamanho da população inicial, para os tratamentos no intervalo de 24 a 30°C. A avaliação da dinâmica populacional é importante na determinação da viabilidade de produção das diferentes espécies de copépodes em laboratório, pois este parâmetro fornece um espectro da produtividade e do desenvolvimento dos animais em um ambiente com limitações nas condições nutricionais e nos parâmetros físicos e químicos. Alguns estudos já demonstraram a influência direta da temperatura sobre o desenvolvimento e sobrevivência de copépodes (MAUCHLINE, 1998; DUSSART; DEFAYE, 2001; PETERSON, 2001), sendo que para diversas espécies como *Acartia* sp., *Paraeuchaeta elongata*, *Sinocalanus tenellus*, *Pseudocalanus newmani*, verificou-se que o tempo de desenvolvimento diminui consideravelmente com o aumento da temperatura (OZAKI; IKEDA, 1998; KIMOTO et al., 1986; LEE et al., 2003; CHINNERY; WILLIAMS, 2004; MILIONE; ZENG, 2009), porém existe uma faixa de temperatura ótima para cada uma delas.

Em relação a proporção sexual, foi observado o predomínio de fêmeas dentro da população, em todos os tratamentos. Outros autores como Camus e Zeng (2010) e Gusmão e Mckinnon (2009) também verificaram uma elevada proporção de fêmeas para essa espécie, tanto em ambiente de laboratório como no ambiente natural, com uma proporção variando entre 74 e 91 % fêmeas. Em muitas espécies de copépodes se observa a proporção sexual de 1: 1, porém algumas espécies não apresentam esse padrão, como é o caso da *B. similis*, sendo que ainda não é bem compreendido o mecanismo exato e todos os fatores envolvidos na determinação sexual (MAUCHLINE, 1998; GUSMÃO; MACKINON, 2009). No presente experimento não foram observadas diferenças significativas da temperatura sobre a proporção sexual de *B. similis*, embora alguns estudos já tenham demonstrado que fatores ambientais, densidade de estocagem e concentração de alimento podem influenciar na proporção sexual de algumas espécies de copépodes (VOORDOUW et al., 2005), como é o caso da temperatura para as espécies *Eurytemora affinis* (KATONA, 1970) e *Pseudodiaptomus newmani* (LEE et al., 2003), sendo que em ambos os trabalhos, a elevação da temperatura resultou em uma variação significativa da proporção de fêmeas na população.

A taxa de fecundidade é um índice frequentemente utilizado para avaliar o crescimento de adultos e da população de copépodes, uma vez que a produção de ovos representa a diferença entre a entrada de energia e os gastos metabólicos (HOLSTE; PECK, 2006). A temperatura é um

dos principais fatores envolvidos na frequência reprodutiva e na regulação da produção de ovos em copépodes calanoida, geralmente apresentando uma correlação positiva até um determinado limite, a partir da qual começa a ocorrer o declínio da produção (HOLSTE; PECK, 2006; CASTRO-LONGORIA, 2003; ARA, 2001). Este efeito da temperatura foi descrito por Milione e Zeng (2008) para *A. sinjiensis*; Rhyne et al. (2009) para *P. pelagicus*; Holste e Peck (2006) para *Acartia tonsa* e Takahashi e Ohno (1996) para *Acartia tsuensis*. No presente estudo também se verificou que o aumento da temperatura apresentou o efeito positivo na fecundidade diária e total de fêmeas de *B. similis*, sendo que o aumento em 10 °C permitiu dobrar a taxa média de produção de ovos, com maior produção sendo observada na temperatura de 32 °C. Esta relação positiva com a temperatura dentro da faixa avaliada já era esperada, uma vez que esta espécie habita regiões tropicais, onde a temperatura varia dentro do intervalo avaliado. Segundo Peck e Holste (2005), o efeito da temperatura na produção de ovos não é apenas espécie específico, mas também pode variar entre diferentes populações.

A temperatura também pode afetar a taxa de eclosão de ovos de copépodes (CASTRO-LONGORIA, 2003; CHINNERY; WILLIAMS, 2004; HOLSTE; PECK, 2006), porém no presente estudo não foram observadas diferenças significativas para a taxa de eclosão dentro da faixa de temperatura avaliada (22 a 32 °C). Estas observações estão de acordo com Milione e Zeng (2008), que também não observaram influência da temperatura para a taxa de eclosão no intervalo entre 25 e 30 °C, porém os autores observaram que a eclosão dos ovos foi significativamente menor em temperaturas abaixo de 15 °C.

A otimização da produtividade dos copépodes é um dos pontos mais importantes para viabilidade de sua criação como alimento vivo na aquicultura (MILIONE; ZENG, 2008). A temperatura possui a vantagem de ser um parâmetro que além de afetar a produtividade dos copépodes ainda pode ser manipulado com certa facilidade dentro de laboratórios de produção de organismos aquáticos. Apesar das vantagens, o controle da temperatura também pode influenciar de forma considerável nos custos de produção. Por isso é importante se determinar a produtividade de diferentes espécies de copépodes em diferentes faixas de temperatura, para avaliar qual delas se ajusta melhor ao modelo de produção e as condições climáticas de cada laboratório.

A determinação de valores ótimos de temperatura no desenvolvimento de copépodes é importante para aquicultura, pois o desenvolvimento mais rápido pode contribuir para o aumento da

produtividade. Em contrapartida, o desenvolvimento mais lento também pode ser benéfico para o uso na larvicultura, pela maior duração do estágio naupliar. Assim a manipulação da temperatura pode ser utilizada como uma importante ferramenta de controle na produção.

11 CONCLUSÃO

A temperatura exerceu influência sobre diversos parâmetros zootécnicos do copépode *Bestiolina similis*. Foi possível verificar que o copépode é resistente às variações abruptas da temperatura, dentro do intervalo de até 8 °C, apresentando maior sensibilidade quando expostos às temperaturas mais elevadas. O intervalo de 24 a 30 °C proporcionou uma melhor taxa de crescimento populacional, enquanto a temperatura de 32° C favoreceu à maior produção de ovos por fêmea. A temperatura de 22°C pode ser utilizada para retardar o desenvolvimento naupliar, porém acarreta em menor taxa de sobrevivência dos animais.

12 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e aos funcionários do LMM-UFSC, do LAPOM-UFSC e do LAPMAR-UFSC pelo suporte técnico.

13 REFERÊNCIAS

- Ara, K., 2001. Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, 445(1-3), 205-215.
- Ban, S., 1994. Effect of temperature and food concentration on post-embryonic development, egg production and adult body size of calanoid copepod *Eurytemora affinis*. *J Plankton Res*, 16(6), pp.721-735.
- Barroso, M.V., C.V.A. de Carvalho, R. Antoniassi, V.R. Cerqueira. 2013. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388-391, 153- 158
- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estevez, A., Shields, R. J., Sargent, J. R., 2003. Optimizing lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211–220.

Bonnet, D., Harris, R., Lopez-Urrutia, A., Halsband-Lenk, C., Greve, W., Valdes, L., Wiltshire, K., 2007. Comparative seasonal dynamics of *Centropages typicus* at seven coastal monitoring stations in the North Sea, English Channel and Bay of Biscay. *Progress in oceanography*, 72(2), 233-248.

Camus, T., Zeng, C., McKinnon, A. D., 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture* 297, 169–175

Camus, T., Zeng, C., 2010. Roles of microalgae on total egg production over female lifespan and egg incubation time, naupliar and copepodite survival, sex ratio and female life expectancy of the copepod *Bestiolina similis*. *Aquaculture Research*, 41(11), 1717-1726.

Castro-Longoria, E., 2003. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. *J Crustacean Biol*, 23(2), 289-299.

Chinnery, F. E., Williams, J. A., 2004. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology* 145, 733-738.

Conceicao, L. E., Yufera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M. T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquac. Res.* 41, 613–640.

Doi, M., Toledo, J. D., Golez, M. S. N., Santos, M. D. L., Ohno, A., 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiology* 358, 259–263.

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A.K., Hansen, B., 2011. W. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed *Aquaculture* 315, 155–166.

Drillet, G., Jørgensen, N. O., Sørensen, T. F., Ramløv, H., Hansen, B.W., 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquac Research* 37(8),756-772.

- Drira, Z., Hassen, M.B., Ayadi, H. and Aleya, L., 2014. What factors drive copepod community distribution in the Gulf of Gabes, Eastern Mediterranean Sea?. *Environ Sci Pollut R* 21(4), 2918-2934..
- Dussart, B. H. and Defaye, D., 2001. Introduction to the Copepoda. In Dumont, H. J. (ed.), *Guides to the Identification of the Macroinvertebrates of the Continental Waters of the World*. 16. Backhuys, Leiden, p. 344.
- Gaudy, R., Cervetto, G. and Pagano, M., 2000. Comparison of the metabolism of *Acartia clausi* and *A. tonsa*: influence of temperature and salinity. *J Exp Mar Biol Ecol* 247(1), 51-65.
- Hall, C.J. and Burns, C.W., 2002. Effects of temperature and salinity on the survival and egg production of *Gladioferens pectinatus* Brady (Copepodas: Calanoida). *Estuar Coast Mar Sci* 55(4), 557-564.
- Holste, L., Peck, M., 2006. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Mar. Biol*, 148, 1061–1070.
- James, C.M., Al-Khars, A.M., 1986. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. *Syllogeus* 58, 333-340.
- Katona, S. K. 1975. Copulation in the copepod *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880). *Crustaceana*, 28 (1), 89-95, 1975.
- Kimoto, K., Uye, S., Onbe, T., 1986. Growth characteristics of a brackish-water calanoid copepod *Smocalanus lenellus* in relation to temperature and salinity. *Bull Plankton Soc. Jap.* 33, 43-57.
- Lampert, W., Sommer, U., 1997. *Limnology: the ecology of lakes and streams*. New York: Oxford University.
- Landry, M. R., 1975. The relationship between temperature and the development of life stages of the marine copepod *Acartia clausi* Giesbr. *Limnol Oceanogr* 20 (5), 854-857.
- Lee, H. W., Ban, S., Ikeda, T., & Matsuishi, T. (2003). Effect of temperature on development, growth and reproduction in the marine copepod *Pseudocalanus newmani* at satiating food condition. *Journal of Plankton Research*, 25(3), 261-271.

Liao, I. C., Su, H. M., Chang, E. Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200, 1-31

Lima, L. C. M., Navarro, D. M. A. F., Souza-Santos, L. P., 2013. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. *J Crustacean Biol* 33, 372-381.

Lubzens, E., Minkoff, G., Barr, Y., Zmora, O. 1997. Mariculture in Israel – past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. *Hydrobiologia* 358, 13-20.

Mauchline, J., 1998. Advances in marine biology—The biology of calanoid copepods. *Adv Mar Biol* 33. p. 710.

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

McKinnon, A. D., Duggan, S., 2001. Summer egg production rates of paracalanid copepods in subtropical waters adjacent to Australia's North West Cape. *Hydrobiologia* 453(1), 121-132.

Mckinnon, A. D., Klumpp, D. W., 1997. Mangrove zooplankton of north Queensland, Australia. *Hydrobiologia* 362(13), 145-160.

Milione, N., Zeng, C., 2008. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 275, 116-123

Miller, D. D., Marcus, N. H., 1994. The effects of salinity and temperature on the density and sinking velocity of eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol* 179(2), 235-252.

Ogle, J. T., Lemus, J. T., Nicholson, L. C., Barnes, D. N., Lotz, J. M., 2005. Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of red snapper *Lutjanus campechanus*. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) *Copepods in aquaculture*. Blackwell, Oxford, p. 225–244

ØIE et al., 2015 Øie, G., Galloway, T., Sørøy, M., Holmvaag Hansen, M., Norheim, I. A., Halseth, C. K., ... & Attramadal, K. (2015). Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod

(*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquaculture Nutrition*.2015.

Olivotto, I., Avella, M. A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C. C., Ruiz, P. N., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283(1), 92-96.

Ozaki, K., Ikeda, T., 1998. Development time and generation length of the mesopelagic copepod *Paraeuchaeta elongata*. *Plankton Biol. Ecol* 45(1), 75-78.

Payne, M., 2000. Cultured copepods as live food for fish. In: McKinnon, D., Rimmer, M., Kolkovski, M. (Eds.), *Hatchery Feeds: Proceedings of a workshop held in Cairns, 9-10 March 2000*, p. 57–62.

Payne, M. F., Rippingale, R. J., 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201, 329-342.

Peterson, W. T., 2001. Patterns in stage duration and development among marine and freshwater calanoid and cyclopoid copepods: a review of rules, physiological constraints, and evolutionary significance. *Hydrobiologia* 453-454, 91–105.

Rajkumar, M., Vasagam, K., 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261,649-658.

Rhyne, A. L., Ohs, C. L., Stenn, E., 2009. Effects of temperature on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture* 292(1), 53-59.

Sampey, A., McKinnon, A. D., Meekan, M. G., McCormick, M. I., 2007. Glimpse into guts: overview of the feeding of larvae of tropical shorefishes. *Mar Ecol Prog Ser* 339, 243–257.

Saravanan, R., Vijayanand, P., Vagelli, A. A., Murugan, A., Shanker, S., Rajagopal, S., Balasubramanian, T., 2013. Breeding and rearing of the two striped cardinalfish, *Apogon quadrifasciatus* (Cuvier, 1828) in captive condition. *Animal Reprod Sci* 137(3), 237-244.

Schipp, G. R., Bosmans, J. M., Marshall, A. J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*,174(1), 81-88.

Schipp, G., 2006. The use of Calanoid copepods in semiintensive, tropical marine fish larviculture. En: Editores: Cruz Suárez LE, Marie DR, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Ortega AG. Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15–17 November. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, p. 84–94.

Shields, R. J., Bell, J. G., Luizi, F. S., Gara, B., Bromage, N. R., Sargent, J. R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J Nut* 129(6), 1186-1194.

Støttrup, J. G., 2003. Production and nutritional value of copepods. In: Støttrup JG, McEvoy LA (eds) Live feeds in marine aquaculture. Blackwell, Oxford, p. 318.

Su, H. M., Cheng, S. H., Chen, T. I., Su, M. S., 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. In: Lee C-S, O' Bryen PJ, Marcus NH (eds) Copepods in aquaculture. Blackwell, Oxford, p. 11–24.

Toledo, J. D., Golez, M. S., Doi M., Ohno, A., 1999. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Sci* 65, 390–397.

Toledo, J. D., Golez, M. S., Ohno, A., 2005. Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of grouper *Epinephelus Coioides*. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) Copepods in aquaculture. Blackwell, Oxford, p. 11–24.

Vanderlugt, K., Lenz, P. H., 2008. Management of nauplius production in the paracalanid, *Bestiolina similis* (Crustacea: Copepoda): effects of stocking densities and culture dilution. *Aquaculture* 276(1), 69-77.

Voordouw, M. J., H., Eve, R., Bradley, R., 2005. Paternal inheritance of the primary sex ratio in a copepod. *Journ of evolut biol* 18.5,1304-1314.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NO CRESCIMENTO POPULACIONAL, PERÍODO DESENVOLVIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPÉPODE *Bestiolina similis*.

Wesley Freitas da Anunciação^{a*}; Mônica Yumi Tsuzuki^a

^a Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. Brasil.
Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura,
Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos, Servidão dos Coroas
503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

*wannunciacao@gmail.com

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista Aquaculture
(A2, Fator de impacto: 1.878)

14 RESUMO

Os copépodes calanoida são considerados como uma alternativa potencial para substituição ou complemento dos alimentos tradicionalmente utilizados pela aquicultura, os rotíferos e a artêmia. Porém o uso de copépodes na aquicultura ainda possui algumas limitações para produção em escala comercial, como a falta de protocolos e a dificuldade de obtenção de elevadas densidades. O fotoperíodo é um parâmetro importante no controle do ciclo circadiano em diversas espécies de animais e dos ciclos migratórios diários e reprodutivos dos copépodes marinhos. Para avaliar o efeito do fotoperíodo no crescimento populacional, desenvolvimento e reprodução do copépode *Bestiolina similis*, foram realizados quatro experimentos, utilizando cinco diferentes fotoperíodos, 0L : 24 E (Luz: Escuro), 8L : 16E, 12L : 12E, 16L : 8E, 24L : 0E. Observamos que o fotoperíodo exerceu influência no crescimento da população, no desenvolvimento e na reprodução d *B. similis*, sendo que a privação de luz provocou um efeito negativo sobre diversos parâmetros produtivos do copépode. Baseados nos resultados do presente estudo, a utilização de ciclos luminoso entre 12 e 24 horas de luz proporciona melhor desempenho zootécnico do copépode *B. similis*.

Palavras-chave: Ciclo luminoso; *Bestiolina similis*; produção de ovos; alimento vivo; aquicultura.

15 ABSTRACT

The calanoid copepods are considered as a potential alternative to replacement or to supplement the food organisms traditionally used in aquaculture, rotifers and artemia. But the use of copepods in aquaculture still has some limitations for commercial production, such as the lack of protocols and the difficulty to obtain high densities in the culture. The photoperiod is an important parameter in controlling the circadian rhythm in several species of animals and in daily migratory and reproductive cycles of marine copepods. To evaluate the effect of photoperiod on population growth, development and reproduction of copepod *Bestiolina similis*, four experiments were carried out using five different photoperiods, 0L: 24 D (light: dark), 8L: 16D, 12L: 12D, 16L: 8D, 24L: 0D. We observed that the photoperiod exerted effect on population growth, development and reproduction of *B. similis* and light deprivation had a negative effect on many productive parameters. Based on the results of the present study, our recommendation is to use cycles between 12 and 24 hours of light for the production of copepod *B. similis*, in order to maximize productivity.

Keywords: Light cycle; *Bestiolina similis*; egg production; live feed; aquaculture.

16 INTRODUÇÃO

Os copépodes são microcrustáceos que fazem parte da cadeia alimentar de larvas de diversas espécies de peixes marinhos no ambiente natural (HOLT, 2003) e são considerados como uma alternativa potencial aos alimentos vivos tradicionalmente utilizados pela aquicultura (STØTTRUP, 2003). Atualmente, a piscicultura marinha ainda é altamente dependente do uso de rotíferos (*Brachionus* sp.) e da artêmia (*Artemia* sp.) nas fases iniciais da produção de larvas. Apesar de possuírem diversas características favoráveis à sua produção, esses alimentos não são adequados para suportar o desenvolvimento de larvas de diversas espécies de peixes marinhos (OLIVOTTO et al., 2008; DRILLET et al., 2011). Neste sentido, se torna cada vez mais necessário o uso de alimentos vivos alternativos, que possam contribuir para o aumento da sobrevivência, do crescimento e da resistência das larvas (STØTTRUP, 2003).

Os copépodes calanoida estão entre os organismos mais promissores para a larvicultura de peixes marinhos (CAMUS; ZENG, 2008), devido ao seu comportamento pelágico em todas as fases de desenvolvimento, pequeno tamanho naupliar e elevado conteúdo de ácidos graxos (SAMPEY et al., 2007; BI et al., 2011). Alguns estudos já demonstraram que larvas alimentadas com copépodes calanoida apresentaram elevada sobrevivência, maior crescimento, diminuição na incidência de deformidades e maior tolerância às condições adversas (KOVEN et al., 2001; VAN der MEREEEN et al., 2008; LEMUS et al., 2010).

A espécie *Bestiolina similis* é um pequeno copépode calanoida, que possui ampla distribuição, sendo frequentemente dominante em áreas costeiras de regiões tropicais e já foi descrito como presa natural de larvas de vários grupos de peixes (BOXSHALL; HALSEY, 2004; SAMPEY et al., 2007). Mckinon et al. (2003) atribuem várias características desejáveis para *B. similis* e a classificam como espécie com grande potencial para a aquicultura.

Apesar de sua importância, o uso de copépodes na aquicultura ainda possui algumas limitações para a produção em escala comercial, entre elas, destacam-se a dificuldade de obtenção de elevadas densidades, a falta de protocolos específicos e alimentação com dietas multialgais, o que resulta em elevados custos de produção (HOLT, 2003; STØTTRUP, 2003). A produtividade dos copépodes está relacionada com uma gama de fatores, incluindo o tipo e a concentração do alimento, a densidade de estocagem e os parâmetros ambientais, como temperatura, salinidade e

fotoperíodo (MAUCHLINE, 1998; CASTRO-LONGORIA, 2003; STØTTRUP, 2003; DRILLET et al., 2011). O fotoperíodo é um parâmetro chave no controle do ciclo circadiano em diversas espécies de animais e dos ciclos migratórios diários em copépodes marinhos (NELSON et al., 2011). Alguns estudos já demonstraram seu efeito na taxa de produção de ovos (STEARNS et al., 1989; CERVETTO et al., 1993; CAMUS; ZENG 2008; MILIOU, 1992), e na taxa de eclosão (PECK; HOLSTE, 2006; JEPSEN et al., 2007) para algumas espécies de copépodes. Porém trabalhos relacionando o fotoperíodo com a produtividade de copépodes ainda são escassos (NELSON et al., 2011).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do fotoperíodo no crescimento populacional, no período de desenvolvimento, na sobrevivência, na fecundidade e na taxa de eclosão de ovos de *B. similis*.

17 MATERIAL E MÉTODOS

17.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO COPÉPODE

Os copépodes foram coletados com o uso de rede de plâncton (300 μm) através de arrasto na superfície da água, na Lagoa da Conceição, Florianópolis, Brasil. Para a separação inicial dos animais foi realizada uma triagem, com o uso de peneiras com diferentes malhas (500, 300 e 150 μm) e auxílio de microscópio estereoscópio. Os animais isolados durante este processo foram mantidos em tanques de 150 L até que se observasse a presença de apenas uma espécie. Após essa verificação, parte do conteúdo dos tanques foi concentrado e fixado em formalina 5%, para a identificação da espécie, que foi realizada pelo Instituto Oceanográfico (IO), São Paulo, e pelo Departamento de Taxonomia da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES.

17.2 MANUTENÇÃO DO COPÉPODE *B. similis*

Após o processo de separação dos animais, os indivíduos adultos foram estocados em tanques de 150 L com leve areação e sistema de recirculação parcial, em que a água recirculava durante o período de 4 a 6 h por dia, passando por um coletor de ovos e náuplios, por um filtro mecânico (50 μm) e por um fracionador de proteínas. Os animais foram mantidos com fotoperíodo de 12 L: 12 E (luz:escuro), salinidade de 30 g . L⁻¹, temperatura 24 \pm 2°C e pH 8.3. Para a alimentação dos copépodes foram fornecidas as microalgas *Isochrysis galbana* e *Cheatoceros muelleri*, na concentração de 1 a 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹ (STØTTRUP,

2003). Os copépodes foram mantidos em laboratório por mais de 20 gerações antes de serem utilizados nos experimentos.

Toda água utilizada nos tanques de produção dos copépodes e nos experimentos realizados passava por sistema de filtragem mecânica (filtro com 50 μm), por tratamento ultravioleta (32w), e era desinfetada com o uso de peróxido de hidrogênio (28 %). Após esse tratamento, a água permanecia em um tanque de 250 L, com fracionador de proteínas.

17.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito do fotoperíodo na dinâmica populacional, no período de desenvolvimento, na fecundidade e na taxa de eclosão de ovos do copépode *B. similis*, através da utilização de cinco tratamentos, 0L : 24E (Luz : Escuro) ($T_{0:24}$); 8L : 16E ($T_{8:16}$); 12L : 12E ($T_{12:12}$); 16L : 8E ($T_{16:8}$) e 24L : 0E ($T_{24:0}$).

As unidades experimentais eram mantidas em banho maria, dentro de cinco câmaras escuras (uma para cada fotoperíodo), que consistiam em aquários de 40 L revestidos com duas camadas de lona preta e interligados por um sistema de recirculação, para que não ocorresse variação da temperatura entre os tratamentos. A função dessas câmaras era de isolar as unidades experimentais nos diferentes fotoperíodos avaliados. Todos os aquários possuíam na parte superior, uma estrutura de PVC para fixação da iluminação, constituída por uma lâmpada fluorescente de 6400 k, com 11 W de potência. A intensidade luminosa mensurada na superfície da água foi de 980 ± 60 lux. Os parâmetros de qualidade da água, salinidade (refratômetro com precisão de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e temperatura (termômetro de mercúrio com precisão de $0,1$ °C) foram monitorados todos os dias, às 8 e 16 h. Os níveis de amônia total e pH (testes colorimétricos API®) foram mensurados a cada três dias. A alimentação dos animais era realizada diariamente com a microalga *Isochrysis galbana*, na concentração de $1,5 \cdot 10^5$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ (STØTTRUP, 2003). Essa estrutura foi utilizada para realização dos experimentos 1, 2, 3 e 4, descritos a seguir.

17.4 EXPERIMENTO 1: DINÂMICA POPULACIONAL

Para realização do experimento foram estocados 12 adultos (8 fêmeas e 4 machos) em unidades experimentais contendo 750 mL de água marinha ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), em triplicata. A renovação de água era realizada a cada três dias, através do sifonamento de 25% do volume dos tanques, com auxílio de peneira com malha de $45\mu\text{m}$, para evitar a remoção de

ovos e náuplios. A microalga *Isochrysis galbana* foi utilizada para a alimentação dos copépodes na concentração de $1,5 \cdot 10^5$ células \cdot mL⁻¹.

Ao final dos 10 dias de experimento, todo o conteúdo das unidades experimentais foi concentrado, fixado em formalina 5% e levado ao microscópio estereoscópio para a contagem e avaliação dos estágios de desenvolvimento, taxa de crescimento específico e para determinação da proporção sexual. A taxa de crescimento específico populacional (K) foi determinada com a utilização da fórmula (LAMPERT; SOMMER, 1997; CAMUS; ZENG; McKINON, 2009):

$$K = \frac{\ln(N_0/N_T)}{T}$$

Onde T é o tempo de duração do experimento (em dias), N_T é a densidade da população ao final do experimento, desconsiderando o número de ovos, e N₀ a densidade inicial de estocagem dos copépodes. O tempo de duplicação da população (T_D) foi avaliado pela fórmula (JAMES; AL-HARS, 1986; LAMPERT; SOMMER, 1997):

$$T_D = \frac{\log_e 2}{K}$$

17.5 EXPERIMENTO 2: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Ovos obtidos de um dos tanques de produção foram separados e estocados em um recipiente de 10 L, durante 24h. Após esse período de incubação, os náuplios recém eclodidos foram contabilizados para estocagem nas unidades experimentais, com base no cálculo volumétrico. Os animais foram acondicionados em unidades experimentais com 500 mL de água marinha (30 g \cdot L⁻¹) na densidade inicial de estocagem de 1000 náuplios \cdot L⁻¹. As três réplicas utilizadas em cada tratamento foram mantidas dentro de câmaras escuras, previamente descritas no item 17.3.

Para a manutenção da qualidade de água durante o experimento era realizada a renovação diária de 20% do volume, através do sifonamento, com auxílio de uma peneira com malha de 45 μ m, para evitar a retirada dos náuplios. Todos os dias foram retiradas três amostras de 40 mL de cada unidade experimental, para o acompanhamento do estágio de desenvolvimento dos copépodes, mensurado através da contagem do número de náuplios, copepoditos e adultos. Os animais foram mantidos vivos durante a contagem, realizada em placas de Petri com auxílio do microscópio estereoscópio, e devolvidos para as respectivas unidades experimentais, com o propósito de não se alterar a

densidade de estocagem ao longo do experimento. Ao se determinar que todos indivíduos de um tratamento alcançaram a fase adulta, todo o conteúdo das unidades experimentais, do respectivo tratamento, era concentrado e fixado com formalina 5%, para posterior contagem e determinação da sobrevivência final, através da comparação do número de indivíduos observados com o número total de indivíduos estocados inicialmente em cada unidade experimental.

17.6 EXPERIMENTO 3: FECUNDIDADE

A produção de ovos por fêmeas de *B. similis* foi monitorada durante quatro dias consecutivos (VANDERLUGT; LENZS, 2009; CAMUS; ZENG; MCKINON, 2009), nos cinco fotoperíodos avaliados. Foram estocados em cada unidade experimental seis indivíduos adultos, 4 fêmeas e 2 machos, separados manualmente com auxílio de microscópio estereoscópio. As unidades experimentais eram compostas de dois recipientes de 180 mL sobrepostos. O recipiente interno teve sua base substituída por uma malha de 120 μm , que servia para isolar os ovos e para facilitar a retirada diária dos adultos (esquema ilustrado no item 42 – Apêndice).

A cada 24 h era realizada a separação dos dois recipientes para a contagem dos ovos, que se concentravam no fundo do recipiente externo, e para a estocagem dos adultos em um novo recipiente. Para a realização desse procedimento, o recipiente interno era gentilmente removido, colocado em uma placa de Petri com água na salinidade de 30 g . L⁻¹ e levado ao microscópio estereoscópio, para verificação da taxa de mortalidade. Caso fosse detectada a mortalidade de algum adulto, este era substituído por outro indivíduo mantido nas mesmas condições experimentais, com mesma idade e sexo (CAMUS; ZENG; MCKINON, 2009). Após esse processo, o recipiente contendo os adultos era colocado em um novo recipiente externo, com água nas mesmas condições de salinidade e temperatura.

Os ovos coletados do recipiente externo eram concentrados em peneira com malha de 45 μm , separados em placas de Petri e levados ao microscópio estereoscópio, para a contagem diária, que foi utilizada no cálculo da taxa de produção de ovos . fêmea . dia⁻¹. (Tp Fêmea).

$$T_p \text{ Fêmea} = \frac{N^\circ \text{ total ovos}}{N^\circ \text{ total de fêmeas}}$$

17.7 EXPERIMENTO 4: TAXA DE ECLOSÃO

Os ovos produzidos durante os três primeiros dias do experimento 3, foram estocados em recipientes de 100 mL, em triplicata, e mantidos com os mesmos parâmetros experimentais descritos previamente no item 17.6. Foram estocados de 40 a 50 ovos em cada unidade experimental. Após o período de incubação de 24 h, os ovos foram concentrados em uma peneira com malha de 45 μm e analisados sob microscópio estereoscópico. Os ovos que não eclodiram e os náuplios recém eclodidos foram contabilizados para o cálculo da taxa de eclosão.

$$\text{Tx. Eclosão} = \left[\frac{(\text{N}^\circ \text{ ovos produzidos} - \text{N}^\circ \text{ ovos não eclodidos})}{\text{N}^\circ \text{ ovos produzidos}} \cdot 100 \right]$$

17.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para taxa de crescimento específico, tempo de duplicação da população; proporção sexual; dinâmica populacional; período de desenvolvimento; sobrevivência; taxa de produção de ovos diária e taxa de eclosão foram analisados através da Análise de Variância Unifatorial (ANOVA), com a utilização do software Statsoft Statistica 10 ®. Médias com diferenças significativas ($p < 0,05$) foram comparadas pelo teste Tukey, para determinação das diferenças específicas entre os tratamentos avaliados. As taxas em porcentagem foram transformadas através da raiz arco-seno. Os dados do teste de desenvolvimento foram submetidos a análise de regressão não linear e a taxa de produção de ovos acumulada à regressão linear. A homocedacidade dos dados foi avaliada pela prova de Levene.

18 RESULTADOS

18.1 EXPERIMENTO 1: DINÂMICA POPULACIONAL

Os resultados para o experimento de dinâmica populacional demonstram que houve maior aumento da população ($p < 0,05$) para os animais mantidos em fotoperíodos superiores a 12 h de luz ($T_{12:12}$; $T_{16:8}$ e $T_{24:0}$) em comparação aos animais mantidos na ausência de luz ($T_{0:24}$) (Tabela 1). Entre os estágios de desenvolvimento, apenas o número de copepoditos apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), em que $T_{24:0}$ apresentou maior população de copepoditos em relação ao $T_{0:24}$ (Tabela 1).

A proporção sexual de *B. similis* após o período de 10 dias não foi influenciada pelo fotoperíodo, sendo possível verificar que a proporção de fêmeas foi predominante em todos os tratamentos, com

média variando de $66,66 \pm 28,86$ ($T_{0:24}$) a $90,00 \pm 17,32$ % ($T_{8:16}$), Tabela 1. A taxa de crescimento específico (K) variou entre $0,405 \pm 0,008$ ($T_{0:24}$) e $0,454 \pm 0,017$ ($T_{24:0}$), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre esses dois tratamentos (Tabela 1). O tempo de duplicação também apresentou melhor resultado ($p < 0,05$) para $T_{24:0}$ em comparação ao $T_{0:24}$ (Tabela 1). Ao final do experimento os níveis de amônia tóxica se mantiveram abaixo de $0,021 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e o pH em $8,0 \pm 0,4$ para todos os tratamentos.

Tabela 1

Média (n=3) e desvio padrão da população total, dos diferentes estágios de desenvolvimento (náuplios, copepoditos, adultos) e proporção de fêmeas (%) para 5 diferentes fotoperíodos (luz : escuro), após 10 dias. Densidade inicial de estocagem de 12 copépodes (8 fêmeas: 4 machos). K é a taxa de crescimento específico. T_D é o tempo de duplicação da população (dias). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey (p <0,05).

| Treatmento | Náuplios | Copepoditos | Adultos | % Fêmeas | Total | K | T _D |
|------------|---------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T0:24 | 242,50±61,39 | 429,16±84,56 ^a | 12,50±11,45 | 66,66±28,86 | 690,83±58,75 ^a | 0,405±0,008 ^a | 1,711±0,036 ^a |
| T8:16 | 389,16±99,28 | 481,66±33,94 ^{ab} | 17,50±7,50 | 90,00±17,32 | 893,33±71,07 ^{ab} | 0,430±0,007 ^{ab} | 1,608±0,029 ^{ab} |
| T12:12 | 386,66±73,83 | 618,33±125,20 ^{ab} | 15,83±7,63 | 87,83±11,26 | 1035,00±197,34 ^b | 0,444±0,018 ^{ab} | 1,560±0,065 ^{ab} |
| T16:8 | 415,00±218,27 | 515,00±18,66 ^{ab} | 18,75±12,37 | 79,72±4,09 | 970,83±251,06 ^{ab} | 0,436±0,027 ^{ab} | 1,590±0,100 ^{ab} |
| T24:0 | 445,00±115,75 | 636,66±115,00 ^b | 22,50±3,53 | 89,64±1,98 | 1140,00±190,98 ^b | 0,454±0,017 ^b | 1,526±0,060 ^b |

18.2 EXPERIMENTO 2: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

O período de desenvolvimento para os diferentes estágios do copépode *B. similis* variou entre os fotoperíodos avaliados, como pode ser observado nas curvas de desenvolvimento da Figura 1 e na Tabela 2. A proporção de náuplios apresentou acentuado declínio no quarto dia, mas sua presença pôde ser detectada (em pequena quantidade) até o quinto dia do experimento, com exceção do T_{16:8}. A presença de copepoditos foi verificada inicialmente no terceiro dia do experimento, $1,55 \pm 1,47\%$ (T_{12:12}) a $6,22 \pm 2,44\%$ (T_{24:0}) e pôde ser observada até o nono dia, para T_{12:12}; T_{16:8}; T_{24:0}, e décimo primeiro dia, para T_{0:24}. A ausência de luz prolongou o tempo de desenvolvimento de copepoditos até adultos, sendo observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) do sexto ao décimo primeiro dia, em que a proporção de adultos para o T_{0:24} foi inferior à dos demais tratamentos. Observamos que a totalidade dos animais alcançou a fase adulta no décimo (T_{12:12}; T_{16:8}; T_{24:0}) décimo primeiro (T_{8:16}) e no décimo segundo dia (T_{0:24}). A sobrevivência final dos copépodes variou entre $46,5 \pm 6,6$ (T_{0:24}) e $64,1 \pm 5,36\%$ (T_{24:0}) e foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelo fotoperíodo, com melhores resultados para os tratamentos T_{12:12}; T_{16:8}; T_{24:0} em relação ao T_{8:16} e T_{0:24}, Figura 2.

Figura 1 - Curvas do desenvolvimento de náuplios, copezpoditos e adultos de *B. similis* (n=4), para cinco fotoperíodos durante o período de 11 dias (n=4)

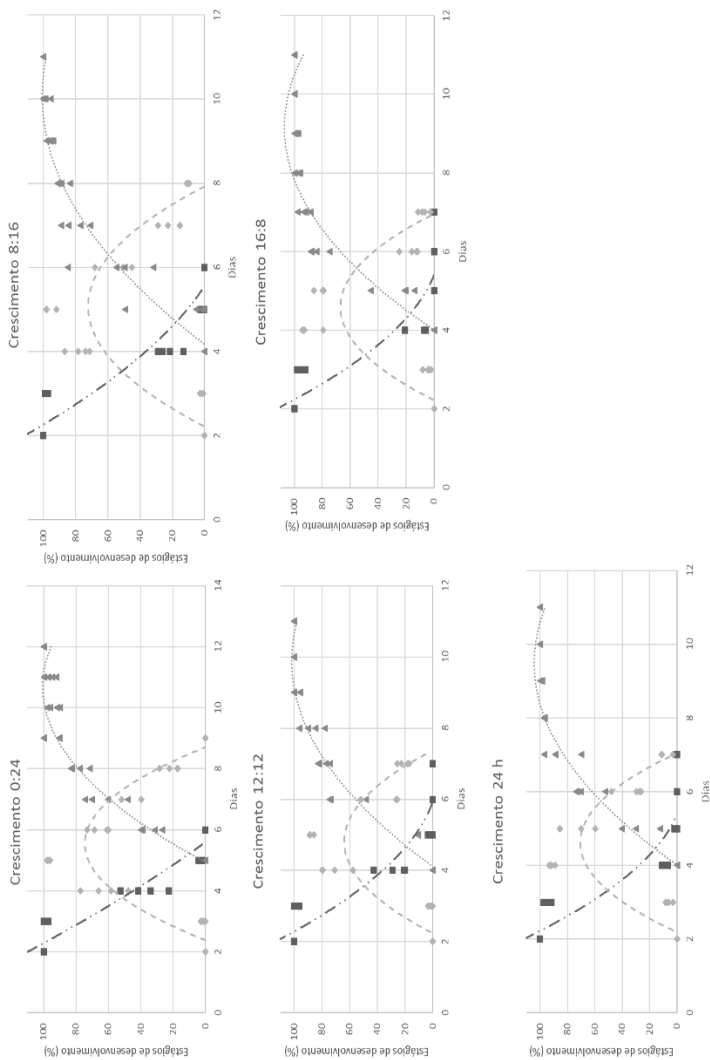
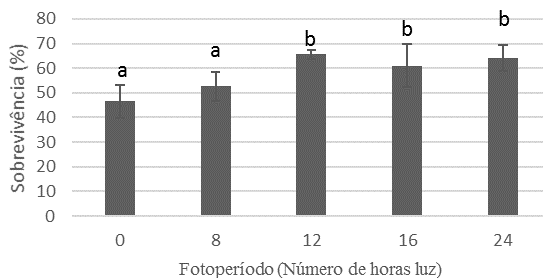


Tabela 2

Equações da regressão e coeficiente de correlação entre os diferentes fotoperíodos avaliados, para os estágios de desenvolvimento.

| Fotoperíodo | Estágio | Equação | R ² |
|-------------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 0L:24E | náuplios | $y = 1,3014x^2 - 40,468x + 185,74$ | 0,889 |
| | copepoditos | $y = -7,4494x^2 + 82,567x - 154,22$ | 0,759 |
| | adultos | $y = -3,0375x^2 + 64,932x - 246,35$ | 0,968 |
| 8L:16E | náuplios | $y = 3,9707x^2 - 61,416x + 218,61$ | 0,874 |
| | copepoditos | $y = -8,8842x^2 + 90,054x - 155,88$ | 0,691 |
| | adultos | $y = -2,9119x^2 + 58,555x - 193,52$ | 0,905 |
| 12L:12E | náuplios | $y = 5,059x^2 - 58,897x + 167,41$ | 0,891 |
| | copepoditos | $y = -9,7087x^2 + 93,288x - 160,14$ | 0,630 |
| | adultos | $y = -3,0562x^2 + 60,397x - 196,61$ | 0,941 |
| 16L:8E | náuplios | $y = 6,5104x^2 - 81,353x + 249,52$ | 0,87 |
| | copepoditos | $y = -11,973x^2 + 109,91x - 185,24$ | 0,604 |
| | adultos | $y = -4,04x^2 + 73,992x - 231,58$ | 0,929 |
| 24L:0E | náuplios | $y = 6,5461x^2 - 81,422x + 248,7$ | 0,872 |
| | copepoditos | $y = -12,004x^2 + 110,83x - 185,14$ | 0,685 |
| | adultos | $y = -3,4873x^2 + 66,127x - 209,2$ | 0,945 |

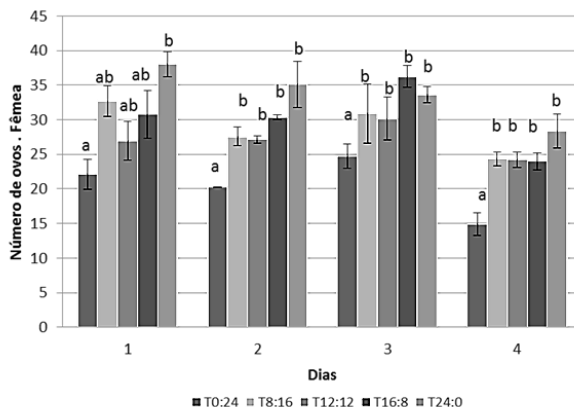
Figura 2 – Sobrevivência final de *B. similis* (Média \pm desvio padrão) em cinco diferentes fotoperíodos. Letras diferentes indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey ($p < 0.05$).



18.3 EXPERIMENTO 3: FECUNDIDADE

O aumento do fotoperíodo influenciou positivamente na produção diária de ovos por fêmeas de *B. similis* (Figura 3), sendo que a ausência de luz influenciou negativamente a produção de ovos ($p < 0,05$) durante todo o período experimental (Figuras 3). A produção diária de ovos não apresentou diferença significativa no intervalo de exposição entre 12 e 24 h de luz.

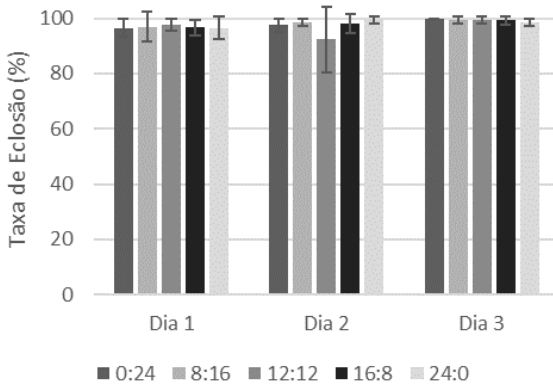
Figura 3 - Fecundidade diária por fêmea durante o período de 4 dias (Média \pm desvio padrão) para cinco fotoperíodos ($n=4$). Letras diferentes indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey ($p < 0.05$).



18.4 EXPERIMENTO 4: TAXA DE ECLOSÃO

O fotoperíodo não apresentou influência significativa ($p < 0,05$) sobre a taxa de eclosão de ovos do copépode *B. similis*. A eclosão foi elevada durante todo o período experimental, se mantendo com média acima de 95%, (Figura 4).

Figura 4 - Média ($n=3$) de desvio padrão da taxa de eclosão de ovos de *B. similis* para diferentes fotoperíodos durante o período de 3 dias.



19 DISCUSSÃO

Poucos trabalhos foram realizados para avaliar os mecanismos de atuação do fotoperíodo e do seu efeito na produtividade de copépodes (PECK; HOLSTE, 2006; NELSON et al., 2011). No presente estudo foi observado que o aumento do fotoperíodo acelerou o processo de desenvolvimento e resultou em maiores taxas de sobrevivência para *B. similis*. Fotoperíodos acima de 12 h luz se mostraram mais adequados para a manutenção da espécie. Essa relação entre o fotoperíodo e o período de desenvolvimento dos copépodes pode estar relacionada à regulação hormonal no processo de muda dos crustáceos (FEREIDOUNI; MESKAR; ASIL, 2015). Apesar do sistema endócrino dos copépodes ainda não estar bem descrito, o processo de muda é similar a dos demais crustáceos e com isso alguns autores sugerem que os copépodes possuem uma regulação hormonal análoga (FLEMINGER, 1985; GUSMAO; MCKINON, 2009). Camus e Zeng (2008) ao avaliarem cinco diferentes

fotoperíodos, também verificaram que o período de desenvolvimento do copépode *Acartia sinjiensis*, do ovo até a fase adulta, foi significativamente menor para animais mantidos em fotoperíodos prolongados de 18 a 24 h de luz, quando comparado com aqueles mantidos em 0 e 6 h luz. Através dessas observações, os autores sugerem que o fotoperíodo pode ser utilizado como uma ferramenta de controle na produção de copépodes, contribuindo para o aumento da produtividade com o uso de fotoperíodos prolongados, ou pode ser utilizado para retardar o desenvolvimento naupliar, aumentando assim o período em que os náuplios estão disponíveis para serem utilizados na larvicultura. Segundo STØTTRUP (2003), fotoperíodos acima de 12 h de luz são mais adequados para a produção de copépodes de uma forma geral.

Apesar do efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento e a reprodução de copépodes ainda não estar bem esclarecido, alguns estudos verificaram que o número de horas de luz a que os animais são expostos pode afetar significativamente a produção de ovos em copépodes calanoida (CAMUS; ZENG, 2008), harpacticoida (MILIOU, 1992) e cyclopoida (FEREIDOUNI; MESKAR; ASIL, 2015). No presente estudo, observamos que o aumento do fotoperíodo afetou positivamente a produção de ovos por fêmeas de *B. similis*, porém não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a taxa de eclosão. Este efeito positivo de ciclos luminosos mais extensos sobre a produção de ovos de *B. similis* aparentemente não está relacionado ao comportamento reprodutivo da espécie, uma vez que já foi reportado por Vanderlungt et al. (2009) que *B. similis* apresenta uma produção contínua de ovos durante 24 h, diferente de outros copépodes que possuem um comportamento mais específico quanto ao ciclo diurno, como algumas espécies do gênero *Acartia* sp., que se reproduzem preferencialmente à noite (MAUCHLINE, 1998) ou algumas espécies do gênero *Calanus* sp., que se reproduzem preferencialmente durante o dia (MAUCHLINE, 1998). Este efeito positivo do aumento do número de horas de luz sobre a produção de ovos pode estar mais relacionado ao fato da espécie *B. similis* habitar regiões tropicais, que possuem naturalmente fotoperíodos mais extensos (CAMUS; ZENG, 2008). Camus, Zeng e Mckinon (2009) observaram que fotoperíodos acima de 12 h luz proporcionaram uma maior produção de ovos por fêmeas para a espécie *Acartia sinjiensis*. Já Peck e Holste (2006) observaram que o fotoperíodo não afetou a produção de ovos do copépode *Acartia tonsa*, mas verificaram um efeito positivo do aumento do fotoperíodo na taxa de eclosão. Laabir et al. (1995) também não observaram diferenças na produção de ovos para o copépode *Calanus helgolandicus* mantidos em três diferentes fotoperíodos, 24L:0E;

12L:12E e 24L:0E. Fereidouni, Meskar, Asil (2015) atribuem essas diferenças observadas sobre a reprodução dos copépodes ao efeito espécie específico dos ciclos luminosos.

Segundo Nelson et al. (2011) existe ainda a possibilidade da influência indireta do fotoperíodo sobre o crescimento e a reprodução de copépodes em função da alimentação, uma vez que diversos estudos já demonstraram que a concentração e a qualidade das microalgas exercem forte efeito sobre produção de ovos em copépodes (KIØRBOE et al., 1985; MAUCLINE, 1998; STOTTRUP, 2003; CAMUS; ZENG, 2008; DRILLET et al., 2011) e que o fotoperíodo e a intensidade luminosa são considerados como fatores chave no controle da produção primária, podendo afetar o crescimento e o perfil nutricional do fitoplâncton (TZOVENIS, DE PAUW; SOGERLOOS, 1997; DIEHL et al., 2002; ISARI, 2014).

A manipulação do fotoperíodo pode favorecer o aumento da produtividade da espécie *B. similis*, sendo uma ferramenta interessante, uma vez que o fotoperíodo é parâmetro facilmente controlado em laboratório.

20 CONCLUSÕES

O fotoperíodo exerceu influência nos índices de crescimento populacional, na taxa de crescimento específico, no tempo de duplicação da população, na sobrevivência, no período de desenvolvimento e na taxa de produção de ovos do copépode *B. similis*. A ausência de luz afetou negativamente os índices zootécnicos do copépode *B. similis*, enquanto ciclos luminosos superiores a 12 h de luz resultaram em melhores índices de produtividade, proporcionando o desenvolvimento mais rápido, maiores taxas de crescimento populacional, de sobrevivência e maior produção de ovos por fêmea durante o período de quatro dias. Porém o fotoperíodo não afetou a proporção sexual, a proporção de adultos na população e a taxa de eclosão. Apesar no ganho em produtividade, é necessário considerar que o aumento do fotoperíodo pode acarretar em maiores gastos com energia elétrica, caso se opte pela utilização da iluminação artificial, sendo importante também realizar a análise econômica da produção.

21 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e aos

funcionários do LMM-UFSC, do LAPOM-UFSC e do LAPMAR-UFSC pelo suporte técnico.

22 REFERÊNCIAS

Bi, H. S., Peterson, W. T., Lamb, J., Casillas, E., 2011. Copepods and salmon: Characterizing the spatial distribution of juvenile salmon along the Washington and Oregon coast, USA, *Fish. Oceanogr.*, 20(2), 125–138.

Boxshall, G. A., Halsey, S. H., 2004. An introduction to copepod diversity. Ray Society, London. p. 940.

Camus, T., Zeng, C., 2008. The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 287, 145–151.

Camus, T., Zeng, C., McKinnon, A. D., 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture* 297, 169-175.

Castro-Longoria, E., 2003. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. *J Crustacean Biol* 23(2), 289-299.

Cervetto, G., Gaudy, R., Pagano, M., Saint-Jean, L., Verriopoulos, G., Arfi, R., Leveau, M., 1993. Diel variations in *Acartia tonsa* feeding, respiration and egg production in a Mediterranean coastal lagoon. *J Plankton Res* 15(11), 1207-1228.

Checkley, D. M., Dagg, M. J., Uye, S. I., 1992. Feeding, excretion and egg production by individuals and populations of the marine, planktonic copepods, *Acartia* spp. and *Centropages furcatus*. *J Plankton Res* 14(1), 71-96.

Diehl, S., Berger, S., Ptacnik, R., Wild, A., 2002. Phytoplankton, light, and nutrients in a gradient of mixing depths: field experiments. *Ecology* 83(2), 399-411.

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A. K., Hansen, B. W., 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315(3), 155-166.

Fereidouni, A. E., Meskar, S., Asil, S. M., 2015. Effects of photoperiod on offspring production, development and generation time, survival, adult sex ratio and total life span of freshwater cyclopoid copepod, *Mesocyclops* sp.: comments on individual variations. *Aquaculture Research* 46, 163-172.

Fleminger, A. 1985 Dimorphism and possible sex change in copepods of the family Calanidae. *Mar Biol* 28:273–294

Gusmão, L. f. M., McKinnon, A. 2009. Sex ratios, intersexuality and sex change in copepods." *J Plankton Res* 31 (9), 1101-1117.

Holt, G. J., 2003. Research in culturing the early life stages of marine ornamental fish. In: *Marine Ornamental Species Collection, Culture and Conservation* (eds J. C. Cato and C. I. Brown), Iowa State Press. p. 252-254.

Isari, S., Zervoudaki, S., Calbet, A., Saiz, E., Ptacnikova, R., Nejstgaard, J. C., Ptacnik, R., 2014. Light-induced changes on the feeding behaviour of the calanoid copepod *Clausocalanus furcatus* (Brady, 1883): evidence from a mesocosm study. *J Plankton Res* 36(5), 1233-1246.

James, C. M., Al-Khars, A. M., 1986. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. *Syllogeus* 58, 333-340.

Jepsen, P. M., Andersen, N., Holm, T., Jørgensen, A. T., Højgaard, J. K., Hansen, B. W., 2007. Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture Res* 38(7), 764-772.

Kiørboe, T., Møhlenberg, F., Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar Ecol Prog Ser* 26(1-2), 85-97.

Koski, M., Kuosa, H., 1999. The effect of temperature, food concentration and female size on the egg production of the planktonic copepod *Acartia bifilosa*. *J Plankton Res* 21, 1779-1790.

Kosobokova, K. N., 1994. Reproduction of the calanoid copepod *Calanus propinquus* in the southern Weddell Sea, Antarctica: observations in laboratory. *Hydrobiologia* 292(1), 219-227.

Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20

: 4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107-122.

Laabir M., Poulet S.A., Ianora A., Miralto A., Cueff A. 1995. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. II. In situ inhibition of embryonic development. *Marine Ecology Progress Series* 129, 97-105.

Lampert, W., Sommer, U., 1997. *Limnology: the ecology of lakes and streams*. New York: Oxford University.

Lemus, J. T., Blaylock, R. B., Apeitos, A., Lotz, J. M., 2010. Short-term effect of first prey type and number on survival and growth of intensively cultured Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae), larvae. *J. World Aquac. Soc.* 41, 455-463.

Mauchline, J., 1998. Advances in marine biology -The biology of calanoid copepods. *Adv Mar Biol* 33. p. 710.

McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223(1), 89-106.

McKinnon, A. D.; Klumpp, D. W, 1997. Mangrove zooplankton of north Queensland, Australia. *Hydrobiologia* 362(1-3), 145-160.

Miliou, H., 1992. Effects of light (photoperiod, spectral composition) on the population dynamics of *Tisbe holothuriae* Humes (Copepods, Harpacticoida). *Hydrobiologia* 232(3), 201-209.

Nelson, R. J., Denlinger, D. L., & Somers, D. E. (Eds.), 2011. *Photoperiodism: the biological calendar*. Oxford University Press.

Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C. C., Malzone, M. G., Carnevali, O., 2008. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture* 284(1), 211-216.

Peck, M. A.; Holste, L., 2006. Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): optimizing intensive cultures. *Aquaculture* 255(1), 341-350.

Rodriguez, V., Guerreo, F., Bautista, B., 1995. Egg production of individual copepods of *Acartia grani* from coastal waters: seasonal and diel variability. *J Plankton Res* 17(12), 2233-2250.

Sampey, A., McKinnon, A. D., Meekan, M. G., McCormick, M. I., 2007. Glimpse into guts: overview of the feeding of larvae of tropical shorefishes. *Mar Ecol Prog Ser* 339, 243-257.

Stearns, D. E., Tester, P., Walker, R. L., 1989. Diel changes in the egg production rate of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida) and relation to environmental factors in two estuaries. *Mar Ecol Prog Ser* 52, 7-16

Støttrup, J. G., 2003. Production and nutritional value of copepods. In: Støttrup JG, McEvoy LA (eds) *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell, Oxford. p. 318.

Støttrup, J. G., Norsker, N. H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155(1), 231-247.

Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1), 217-229.

Tzovenis, I., De Pauw, N., Sorgeloos, P., 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO). *Aquaculture Inter* 5(6), 489-507.

Van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre K., Fyhn, H. J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274, 375-397.

Van der Lugt, K., Cooney, M.J., Lechner, A., Lenz, P.H., 2009. Cultivation of the paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Crustacea). *J World Aquaculture Soc* 40, 523-635.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO E NA REPRODUÇÃO DO COPEÓDE *Bestiolina similis*

Wesley Freitas da Anunciação^{a*}; Mônica Yumi Tsuzuki^a

^a Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. Brasil.
Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura,
Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos, Servidão dos Coroas
503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

*wannunciacao@gmail.com

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista Aquaculture
Research (A2, Fator de impacto: 1.376)

23 RESUMO

O interesse por espécies marinhas produzidas em cativeiro vem aumentando nos últimos anos, porém larvas de diversas espécies de peixes com grande demanda de mercado, como as garoupas e os pargos, não são aptas a se alimentarem de organismos tradicionalmente utilizados na aquicultura, o que resulta em baixa sobrevivência e crescimento. Os copépodes calanoida estão entre as alternativas potenciais e possuem a vantagem de ser o alimento natural de um grande número de espécies marinhas. O copépode *Bestiolina similis* apresenta elevado valor nutricional e características favoráveis para sua produção em cativeiro. Porém, para maximizar a produção de copépodes é importante identificar as condições ótimas para a criação dos animais em ambiente controlado. A salinidade é um parâmetro ambiental que pode influenciar o crescimento e a reprodução de copépodes calanoida. Para testar o efeito da salinidade na produção de *B. similis* foram realizados diferentes experimentos avaliando a dinâmica populacional, capacidade reprodutiva e desenvolvimento, utilizando 5 diferentes salinidades, 15, 20, 25, 30 e 35 g . L⁻¹. Também foi avaliada a tolerância à variações abruptas de salinidade, compreendendo a faixa entre 0 e 50 g . L⁻¹, para náuplios e adultos. Através dos resultados do presente estudo, foi possível observar que o copépode *B. similis* é uma espécie que se adapta bem à ampla faixa de salinidade, sendo que os animais mantidos entre 25 e 35 g . L⁻¹ apresentaram maior fecundidade e maior desenvolvimento. A espécie também se mostrou resistente a variação abrupta a salinidade, apresentando elevada sobrevivência no intervalo de 10 a 50 g . L⁻¹, para adultos e de e 10 a 45 g . L⁻¹, para náuplios. Porém a salinidade não influenciou significativamente na proporção sexual, no tamanho e na composição da população. A taxa de eclosão foi elevada em todas as salinidades, não sendo influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelos tratamentos avaliados.

Palavras-chave: Alimento vivo, Calanoida, *Bestiolina similis*, produção de ovos, aquicultura.

24 ABSTRACT

The interest in marine species produced in captivity has been increasing in recent years, but larvae of several species of fish with high market demand, such as groupers and snappers, still are not able to feed on organisms traditionally used in aquaculture, which results in low survival and growth. The copepods are between the potential alternatives to substitute or complement the traditional live feeds and have the advantage of being the natural food of a large number of marine species. The copepod *Bestiolina similis* has a high nutritional value and favorable characteristics for its production in captivity. However, to maximize the copepod production is important to identify the optimal conditions for the copepods culture in a controlled environment. Salinity is an environmental parameter that influence on the growth and reproduction of copepods calanoida. To investigate the effect of the salinity in the production of *B. similis*, different experiments were conducted to evaluate the population dynamics, reproductive capacity and development, using 5 different salinities, 15, 20, 25, 30 and 35 g. L⁻¹. The tolerance to abrupt variations in salinity was also evaluated, comprising the range between 0 and 50 g. L⁻¹, for nauplii and adults. Through the results of this study, we observed that the copepod *B. similis* is a species that adapts well to the wide range of salinity, and the animals kept between 25 and 35 g. L⁻¹ showed higher development and fecundity. The species was resistant to abrupt variation in salinity, with a high survival in the range of 10 to 50 g. L⁻¹, for adults, and 10 to 45 g. L⁻¹, for nauplii. However, the salinity did not significantly influence the sex ratio, size and composition of the population. The hatching rate was high in all salinities.

Keywords: Live feed, *Bestiolina similis*, egg production, aquaculture.

25 INTRODUÇÃO

O interesse por espécies marinhas produzidas em cativeiro vem aumentando nos últimos anos, sendo a produção aquícola vista como uma alternativa mais sustentável à pesca de peixes de corte e ornamentais (KLINE ; LAIDLEY, 2015). Porém as larvas de muitas espécies de peixes marinhos que possuem grande demanda de mercado, como garoupas e pargos (TOLEDO et al., 1999), apresentam baixa sobrevivência quando alimentadas com organismos tradicionalmente utilizados na aquicultura, como rotíferos (*Brachionus* sp.) e artêmia (*Artemia* sp.), o que resulta em baixa sobrevivência e crescimento (OSTROWSKI; LAIDLEY, 2001), além do aumento na incidência de deformidade (McEVOY et al., 1998). Para contornar essas limitações, diversos alimentos alternativos vêm sendo pesquisados ao longo das últimas décadas (LAVENS; SORGELOS, 1996; STØTTRUP, 2003; OLIVOTTO et al., 2005).

Entre essas alternativas estão os copépodos, microcrustáceos produzidos em laboratório desde a década de 60 (MAUCLINE, 1998; DRILLET et al., 2011), que possuem a vantagem de ser o alimento natural de um grande número de espécies marinhas, apresentando características desejáveis como perfil nutricional, padrão natatório e pequeno tamanho naupliar (STØTTRUP, 2003). Os copépodos são ricos em ácidos graxos essenciais, entre eles os ácidos poliinsaturados, fundamentais para o desenvolvimento e a sobrevivência de larvas de peixes marinhos (SARGENT; FALK-PETERSEN, 1988; McEVOY et al., 1998).

A principal forma de uso dos copépodos na aquicultura tem sido através de coletas no ambiente natural ou em viveiros (LEMUS et al., 2004). Apesar da possibilidade de obtenção de elevada biomassa, esses métodos de coleta são altamente dependentes das condições ambientais e de ciclos meteorológicos, apresentando grande sazonalidade na abundância e concentração dos organismos, além de apresentarem o risco da introdução de vetores de doenças e parasitas (KNUCKEY et al. 2005). Em contrapartida, a produção intensiva em laboratório permite um grande controle sob os aspectos de biossegurança e de produtividade. Apesar das vantagens, a tecnologia de produção intensiva ainda está em desenvolvimento, necessitando de avanços em diversos aspectos para que se alcance um nível confiável para escala comercial (DRILLET et al., 2011; SCHIPP et al., 1999; STØTTRUP, 2003). Mesmo com o aumento no número de pesquisas em técnicas de produção de copépodos, um dos principais problemas ainda é a dificuldade da obtenção de elevadas densidades na produção, principalmente para os copépodos calanoida (CAMUS; ZENG; MCKINON, 2009; DRILLET et al., 2011).

Para maximizar a produção de copépodes é importante se identificar as condições ótimas para a criação dos animais em ambiente controlado. Alguns parâmetros como temperatura e salinidade são conhecidos por afetar a produtividade de copépodes tanto no ambiente natural como em cativeiro (RHYNE et al., 2010). Os efeitos da salinidade sobre o crescimento e a reprodução já foram verificados para várias espécies de copépodes, entre elas, o harpacticoida *Tisbe biminiensis* (SOUZA SANTOS et al., 2006) e os calanoida *Pseudodiaptomus pelagicus* (OHS et al., 2010); *Pseudodiaptomus annandalei* (CHENG et al., 2006); *Pseudodiaptomus richardi* (KAMINSKY et al., 2009); *Acartia tonsa* (HOLSTE; PECK, 2006); *Acartia sinjiensis* (MILIONE; ZENG, 2008); *Acartia bifilosa*, *Acartia clausi* e *Acartia discaudata* (CHINNERY; WILLIAMS, 2004).

A espécie *Bestiolina similis* é um pequeno copépode paracalanoida de ampla distribuição em águas temperadas e tropicais, frequentemente dominante em comunidades costeiras próximas à superfície da água (McKINNON; DUGGAN, 2001) sendo uma das presas preferidas de larvas de diversas famílias de peixes tropicais no ambiente natural (SAMPEY et al., 2007). A espécie apresenta elevado valor nutricional, além de apresentar características favoráveis ao seu uso na larvicultura, como pequeno tamanho (náuplios com cerca de 70 μm) e suscetibilidade a predação, sendo sugerida como uma espécie com grande potencial para a aquicultura (McKINNON et al., 2003).

Foram realizados diversos experimentos no presente estudo para mensurar o efeito da salinidade no período de desenvolvimento, sobrevivência, crescimento populacional e na reprodução do copépode *B. similis*, com o objetivo de definir uma faixa de salinidade adequada para produção do copépode.

26 MATERIAL E MÉTODOS

26.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE COPÉPODES

Copépodes coletados na Lagoa da Conceição (Florianópolis; SC), com o uso de rede de zooplâncton (malha de 300 μm), foram separados em peneiras com diferentes aberturas de malha (500, 300 e 150 μm) e posteriormente isolados no microscópio estereoscópico. Após esse procedimento, os animais foram transferidos para tanques cilíndricos de 150 L, dotados de leve aeração, e água com parâmetros físico-químicos semelhantes aos mensurados no momento e no local da coleta, salinidade 30 g . L⁻¹, temperatura 24 \pm 2°C (Média \pm DP) e pH 8,3. A alimentação dos animais era realizada diariamente com as microalgas *Isochrysis*

galbana e *Chaetoceros muelleri* (1:1) na concentração de 1,0 a $1,5 \cdot 10^5$ células \cdot mL⁻¹ (STØTTRUP, 2003).

Para a análise e identificação da espécie, os animais foram fixados em formalina 5% e enviados para departamento de taxonomia do IO - SP (Instituto Oceanográfico - São Paulo) e do Departamento de Taxonomia da UFES (Universidade Federal do Espírito Santo). Os copépodes foram mantidos por mais de 20 gerações no laboratório antes do início dos experimentos.

A água utilizada na manutenção dos copépodes e nos experimentos realizados passava por um sistema de filtragem mecânica (50 μ m), filtragem físico-química (fracionador de proteínas), tratamento ultravioleta (32w) e desinfecção com o uso de peróxido de hidrogênio 28 %.

26.2 DESENHO EXPERIMENTAL

26.3 EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA SALINIDADE

Foram realizados dois testes distintos para avaliar a tolerância de náuplios e adultos do copépode *B. similis* às variações abruptas da salinidade, sendo utilizados 500 ± 24 náuplios no primeiro teste e 100 ± 22 adultos no segundo, em triplicata. Para a classificação e quantificação dos animais foram retirados 20 L de um dos tanques de produção, previamente ajustado a salinidade de $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Os animais foram então concentrados em tela de 45 μ m e foi feita a retirada de 10 alíquotas de 25 mL, para contagem e estimativa do número total de animas, com base no cálculo volumétrico. Após esse procedimento, os copépodes foram transferidos para as unidades experimentais de 500 mL, durante o período de 24 h e sem aclimação prévia e expostos a 11 diferentes salinidades, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, obtida através de evaporação natural e diluição da água do mar ($35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Ao final do experimento, 50% dos animais foram coletados em peneira com malha de 45 μ m para a determinação da sobrevivência final, através da contagem do número total de animais vivos e mortos em cada unidade experimental. A temperatura foi mantida em $26,0 \pm 1,0$ °C e o fotoperíodo em 12L : 12E.

26.4 ACLIMATAÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES

Para a realização dos experimentos de dinâmica populacional (experimento 2, item 26.5), desenvolvimento (experimento 3, item 26.6) e capacidade reprodutiva (experimento 4, item 26.7), descritos a seguir, foram separados os náuplios de um dos tanques de produção, previamente ajustado à salinidade 25 g . L⁻¹, e distribuídos igualmente em 5 tanques de aclimatação com 30 L de água marinha, 25 g . L⁻¹. A salinidade desses tanques foi alterada diariamente em no máximo de 2,5 g . L⁻¹, até se obter a salinidade correspondente para os tratamentos avaliados nos experimentos, 15 (T₁₅); 20 (T₂₀); 25 (T₂₅); 30 (T₃₀) e 35 (T₃₅) g . L⁻¹. Os animais foram mantidos nos tanques de aclimatação por três gerações, cerca de 40 dias, antes de serem estocados nas unidades experimentais. Este procedimento foi realizado para cada um dos experimentos.

26.5 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL

Para avaliar a dinâmica populacional foram utilizadas unidades experimentais com 750 mL de água marinha (conforme o tratamento avaliado, 15; 20; 25 30; 35 g . L⁻¹), em triplicata, dotadas de leve aeração. Em cada repetição foram estocados 12 adultos (8 fêmeas e 4 machos) previamente aclimatados às salinidades teste. A temperatura foi mantida em 27 ± 1 °C e o fotoperíodo em 12L : 12E. A microalga *Isocrysis galbana* foi utilizada para a alimentação dos copépodes na concentração média de 1,0 a 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹.

A cada três dias era realizada a renovação de 25% do volume das unidades experimentais, através do sifonamento da água com auxílio de uma peneira com malha de 45µm, para evitar a retirada dos náuplios. Durante o processo de renovação da água era feita a correção da salinidade, caso necessário. Após o período de 10 dias, todo conteúdo foi filtrado e fixado em formalina, para a análise através da contagem de náuplios, copepoditos e adultos (machos e fêmeas). A taxa de crescimento específico da população (K) foi calculada segundo a seguinte fórmula (CAMUS; ZENG; McKINON, 2009; LAMPERT; SOMMER, 1997):

$$K = \frac{\ln(N_0/N_T)}{T}$$

Onde T é tempo de produção (em dias) N_T é densidade final da população, desconsiderando o número de ovos, e N₀ a densidade inicial de estocagem da população (12 adultos). Também foi calculado o tempo duplicação da população (T_D) dividindo-se o log_e2 pela taxa de crescimento específico da população (K) (JAMES; ALKHARS,1986; LAMPERT; SOMMER, 1997):

$$T_D = \frac{\text{Log}_e 2}{K}$$

26.6 EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Para avaliar o período de desenvolvimento de *B. similis* foram utilizados náuplios recém eclodidos, previamente separados dos tanques de aclimação. Os animais foram contabilizados e distribuídos nas unidades experimentais (4 réplicas), na densidade inicial de estocagem de 1000 náuplios . L⁻¹, baseada no cálculo volumétrico. As unidades experimentais com 500 mL de água foram mantidas em banho-maria, com temperatura de 25 ± 0,8 °C e fotoperíodo controlado (12L : 12E). Os tratamentos utilizados consistiam de cinco diferentes salinidades, 15, 20, 25, 30 e 35 g . L⁻¹.

Para a manutenção da qualidade da água, 20% desta foi renovada diariamente através do sifonamento, com auxílio de peneira com malha de 45 µm, para evitar a remoção dos náuplios e copepoditos. A microalga *Isochrysis galbana* foi utilizada na alimentação diária dos animais na concentração média de 1,5 . 10⁵ células . mL⁻¹ e ofertada após a renovação da água. Os parâmetros de qualidade da água, amônia total (teste colorimétrico API®); pH (teste colorimétrico Alcon®) foram monitorados a cada três dias. A temperatura (termômetro de mercúrio) e a salinidade (refratômetro, precisão de 1 g . L⁻¹) foram monitoradas durante os 12 dias do período experimental.

O conteúdo de cada um dos recipientes foi diariamente homogeneizado e foram coletadas amostras de 40 mL (em triplicata) para se acompanhar o estágio de desenvolvimento dos copépodes através da taxa de desenvolvimento diário, que consiste na porcentagem diária observada para cada estágio de desenvolvimento (náuplios, copepoditos e adultos). Os animais foram contabilizados vivos no microscópio estereoscópio e devolvidos às unidades experimentais. Esse procedimento foi previamente testado para avaliar a resistência dos animais ao manejo. Ao se detectar que a totalidade dos copépodes em um determinado tratamento havia chegado à fase adulta, todo o conteúdo das unidades experimentais, do respectivo tratamento, era concentrado em peneira com malha de 45 µm e fixado em formalina 5%, para posterior contagem e determinação da sobrevivência final.

26.7 EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO

Para avaliar a produção de ovos por fêmeas de *B. similis* foram utilizados animais previamente aclimatados em cada uma das salinidades analisadas (15, 20, 25, 30, 35 g . L⁻¹), separados manualmente com auxílio de microscópio estereoscópio e estocados nas unidades experimentais, na densidade de seis indivíduos adultos (4 fêmeas e 2 machos). Os animais foram sexados com base no segmento genital do urossomo, no tamanho e no formato das antênulas. Cada unidade experimental de 180 mL era composta por dois recipientes sobrepostos, sendo que a base do recipiente interno foi substituída por uma malha de 120 µm. O uso dessa malha serviu para isolar os indivíduos adultos e para permitir a sua remoção diária, sem remover os ovos, que se concentravam no fundo do recipiente externo (esquema ilustrado no item 42 – Apêndice). Durante esse processo os animais adultos eram contabilizados e caso houvesse alguma mortalidade era feita a reposição por outro indivíduo mantido nas mesmas condições experimentais, com mesma idade e sexo (adaptado de CAMUS; ZENG; McKINON, 2009). As unidades experimentais foram mantidas em banho-maria dentro de um tanque de fibra, com temperatura (25 ± 1.2 °C) e fotoperíodo (12L: 12E) controlados.

Os ovos produzidos foram concentrados em peneira com malha de 45 µm e separados em placas de Petri para a contagem diária no microscópio estereoscópio, utilizada no cálculo da taxa de produção de ovos . fêmea . dia⁻¹. (Tp Fêmea).

$$Tp_{\text{Fêmea}} = \frac{N^{\circ} \text{ total ovos}}{N^{\circ} \text{ total de fêmeas}}$$

Após a contagem diária, cerca de 50 ovos produzidos em cada unidade experimental, durante os três primeiros dias de experimento, foram incubados em recipientes cilíndricos de 100 mL por 24 h. Os ovos foram mantidos com as mesmas condições de temperatura e salinidade dos tratamentos avaliados, porém com fotoperíodo de 24h luz. Após este período, os ovos foram concentrados e analisados em placas de Petri, sob microscópio estereoscópico. Os ovos que não eclodiram e os náuplios recém eclodidos foram contabilizados para o cálculo da taxa de eclosão (Tx Eclosão):

$$Tx_{\text{Eclosão}} = \frac{[(N^{\circ} \text{ ovos produzidos} - N^{\circ} \text{ ovos não eclodidos}) \cdot 100]}{N^{\circ} \text{ ovos produzidos}}$$

26.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

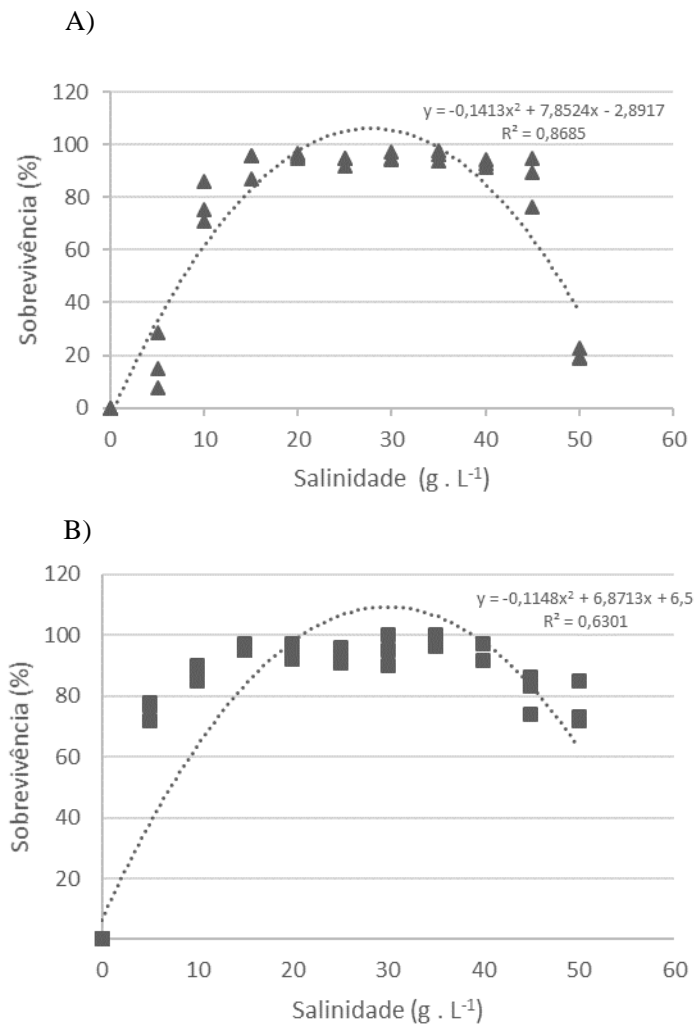
Os dados da taxa de crescimento específico, tempo de duplicação da população, proporção sexual, dinâmica populacional, sobrevivência, taxa de fecundidade e taxa de eclosão foram à Análise de Variância Unifatorial (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o software Statsoft Statistica 10®. Os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homocedasticidade e aqueles que não apresentaram variâncias homogêneas foram transformados pela transformação Box Cox. As taxas em porcentagem de sobrevivência, desenvolvimento e eclosão dos ovos foram transformadas através da raiz arco-seno. Os dados dos experimentos de choque de salinidade e de desenvolvimento foram submetidos a análise de regressão não linear.

27 RESULTADOS

27.1 EXPERIMENTO 1: VARIAÇÃO ABRUPTA DA SALINIDADE

Os adultos se mostraram mais resistentes a uma maior variação da salinidade, conforme pode ser verificado na Figura 1A e 1B. Os náuplios apresentaram elevadas taxas de mortalidade nas salinidades extremas, abaixo de 10 e acima de 45 g . L⁻¹, porém dentro do intervalo de 15 a 45 g . L⁻¹ não foram identificadas grandes variações, com sobrevivência média acima de 85 %. Para os adultos observou-se elevada sobrevivência, com média acima de 80%, dentro do intervalo de 10 a 45 g . L⁻¹ (Figura 1B). Mesmo em baixas salinidades, como observado em 5 g . L⁻¹, a sobrevivência se manteve em níveis acima de 70 % para os adultos. Porém foi observada mortalidade total para ambos os estágios em 0 g . L⁻¹.

Figura 1 - Média (n=3) de sobrevivência (24h) de náuplios (A) e adultos (B) de *B. similis* expostos à variação abrupta da salinidade (salinidade controle 25 g . L⁻¹).



27.2 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA POPULACIONAL

Foi observado um considerável aumento da população a partir da população inicial (12 adultos) para todos os tratamentos, sendo que a

população total de copépodes ao final do experimento variou entre $632,38 \pm 64,38$ (T_{35}) e $808 \pm 143,51$ (T_{25}) indivíduos (Tabela 1). Os copepoditos foram o estágio predominante dentro da composição populacional, variando de $310 \pm 50,91$ (T_{15}) a $509 \pm 24,82$ indivíduos (T_{25}) e representando de $49,75 \pm 16,7$ (T_{20}) a $70,27 \pm 19,0$ % (T_{30}) da população, Tabela 1 e Figura 2A. A densidade de adultos foi a que menos variou entre os tratamentos, ficando entre $108 \pm 39,77$ (T_{15}) e $132 \pm 29,33$ (T_{30}) indivíduos.

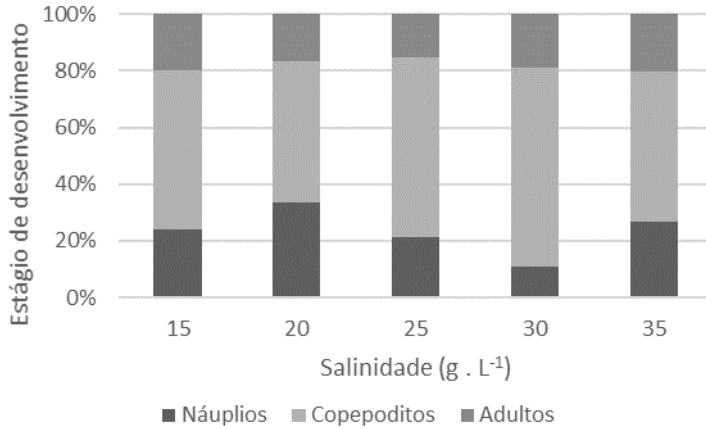
Em relação à proporção sexual foi observado o predomínio de fêmeas na população final, variando de 82 (T_{35}) a 89 % (T_{25}), porém não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes salinidades avaliadas, Figura 2B. A taxa de crescimento específico e o tempo de duplicação também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 1). Os níveis de amônia tóxica se mantiveram abaixo de $0,017 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para todos os tratamentos.

Tabela 1

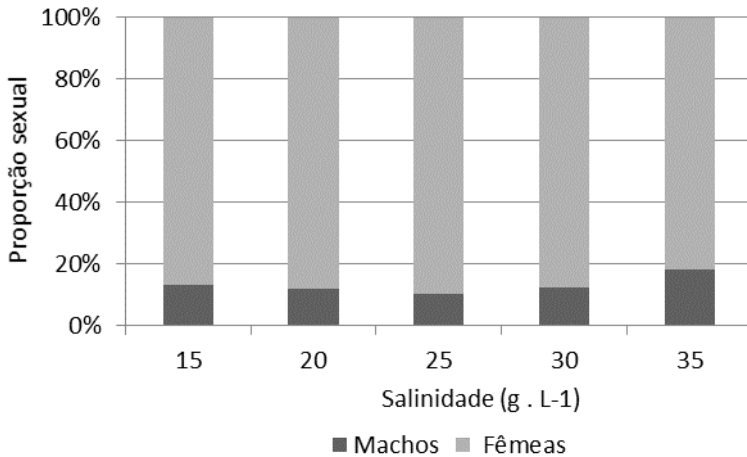
Média (n=3) e desvio padrão da população total e em diferentes estágios de desenvolvimento (náuplios, copepoditos, adultos) e crescimento da população (K - taxa de crescimento específico, T_D - tempo de duplicação da população, em dias) para 5 diferentes salinidades, após 10 dias. Densidade inicial de estocagem de 12 copépodes (8 fêmeas: 4 machos). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas determinadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

| <u>Tratamento</u> | Náuplios | Copepoditos | Adultos | Total | K | T _D |
|-------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-----------|----------------|
| T ₁₅ | 132,60±89,67 | 310,60±101,80 | 108,60±39,70 | 638,67±247,64 | 0,39±0,06 | 1,79±0,23 |
| T ₂₀ | 226,00±82,01 | 336,00±113,50 | 113,33±21,10 | 724,00±25,45 | 0,42±0,02 | 1,64±0,09 |
| T ₂₅ | 168,60±78,42 | 509,30±49,80 | 122,00±12,60 | 808,00±143,51 | 0,42±0,02 | 1,65±0,07 |
| T ₃₀ | 74,00±43,70 | 487,00±108,40 | 132,00±29,30 | 713,00±202,23 | 0,41±0,03 | 1,78±0,14 |
| T ₃₅ | 164,66±102,59 | 324,00±119,90 | 126,00±16,00 | 632,38±64,38 | 0,40±0,01 | 1,75±0,04 |

Figura 2 - Média (n=3) dos diferentes estágios de desenvolvimento (náuplios, copepodito, adultos) na composição da população (A) e na proporção sexual de adultos de *B. similis* (B), após o período de 10 dias (A)



B)



27. 3 EXPERIMENTO 3: PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

O período de desenvolvimento de *B.similis* variou nas diferentes salinidades avaliadas, Figura 3 e Tabela 2. O número de náuplios caiu acentuadamente a partir do terceiro dia, não sendo observada a sua presença após o sexto dia, para todos os tratamentos. Os copepoditos foram o estágio predominante no quarto e quinto dia. O T₂₅ apresentou o menor período ($p < 0,05$) para que a população atingisse a maturação total, que ocorreu no nono dia, em comparação ao T₁₅, T₃₀ e T₃₅. O T₁₅ e T₃₅ foram os que apresentaram o maior tempo de geração ($p < 0,05$), com a população alcançando a maturidade total apenas no décimo segundo dia (Figura 3). Ao final do experimento a sobrevivência média variou entre $43,85 \pm 5,08$ (T₂₀) e $64,46 \pm 9,92$ % (T₃₀), porém não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 4).

Figura 3 - Curvas do desenvolvimento de náuplios (■), copepoditos (◆) e adultos (▲) de *B. similis*, para cinco salinidades durante o período de 12 dias (n=4).

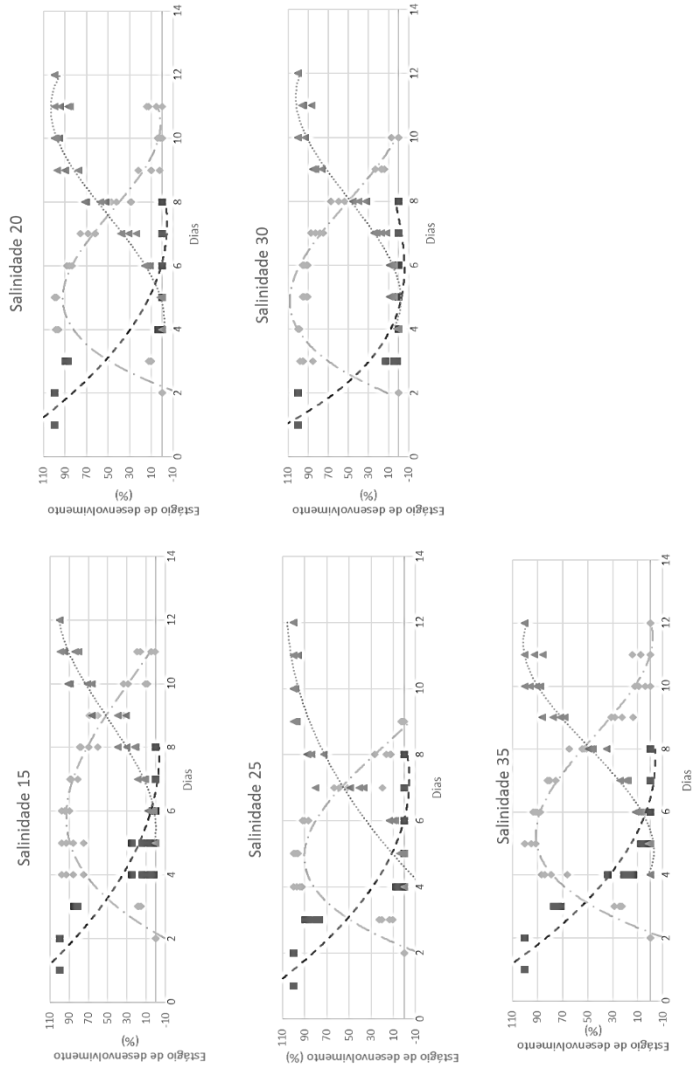
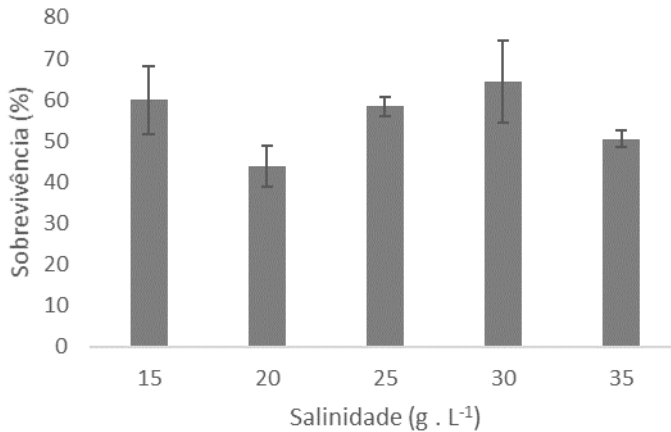


Tabela 2 Equações da regressão e coeficiente de correlação entre as diferentes salinidades avaliadas, para os estágios de desenvolvimento.

| Salinidade | Estágio | Equação | R ² |
|------------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 15 | Náuplios | $y = 2,5416x^2 - 40,069x + 154,03$ | 0,875 |
| | Copepoditos | $y = -4,5707x^2 + 58,824x - 98,289$ | 0,841 |
| | Adultos | $Y = 0,8412x^2 + 1,6594x - 34,075$ | 0,936 |
| 20 | Náuplios | $y = 3,1009x^2 - 45,401x + 161,66$ | 0,835 |
| | Copepoditos | $Y = -5,8798x^2 + 68,119x - 112,17$ | 0,857 |
| | Adultos | $y = -0,8388x^2 + 28,395x - 113,51$ | 0,926 |
| 25 | Náuplios | $y = 3,1522x^2 - 45,678x + 161,1$ | 0,855 |
| | Copepoditos | $y = -7,859x^2 + 84,813x - 141,66$ | 0,797 |
| | Adultos | $y = -1,7141x^2 + 42,655x - 159,61$ | 0,903 |
| 30 | Náuplios | $y = 6,6583x^2 - 69,735x + 177,29$ | 0,836 |
| | Copepoditos | $y = -5,8142x^2 + 69,236x - 107,05$ | 0,733 |
| | Adultos | $y = 0,7887x^2 + 1,8754x - 20,455$ | 0,910 |
| 35 | Náuplios | $y = 2,7122x^2 - 41,596x + 155,39$ | 0,909 |
| | Copepoditos | $y = -4,3446x^2 + 53,52x - 82,204$ | 0,798 |
| | Adultos | $y = 0,132x^2 + 12,995x - 64,584$ | 0,930 |

Figura 4 - Sobrevivência final (Média \pm desvio padrão) de *B. similis* em diferentes salinidades.



27.4 EXPERIMENTO 4: FECUNDIDADE E TAXA DE ECLOSÃO

Os resultados da taxa de fecundidade estão resumidos na Tabela 3. A salinidade influenciou significativamente ($p < 0,05$) a taxa de produção de ovos a partir do segundo dia de experimento. A fecundidade acumulada por fêmea também apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo observada uma maior fecundidade no T₂₅ ($95,26 \pm 20,52$. ovos . fêmea⁻¹) quando comparada com T₁₅ e T₂₀.

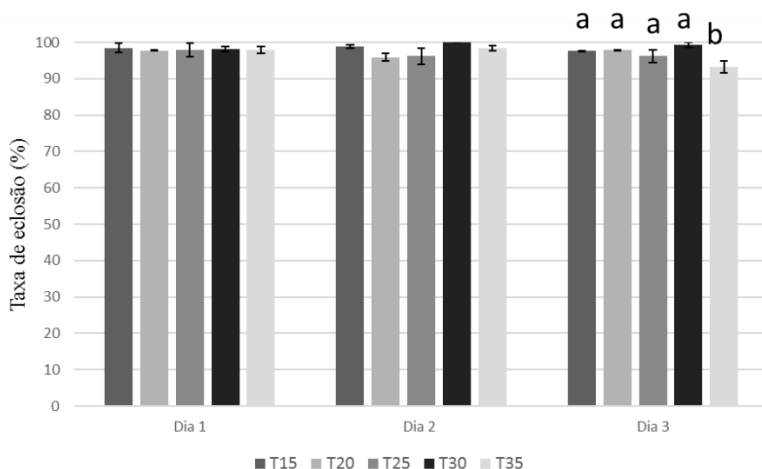
A taxa de eclosão de ovos foi elevada, mantendo-se com uma média acima de 93% para todos os tratamentos durante o período experimental, conforme pode ser verificado na Figura 3. Não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos dias 1 e 2. Apenas no terceiro dia, o T₃₅ apresentou taxa de eclosão inferior aos demais tratamentos ($p < 0,05$), Figura 3.

Tabela 3

Média (n=4) e desvio padrão da fecundidade média diária por fêmea e fecundidade total acumulada por fêmea, durante o período de 4 dias, para cinco salinidades. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

| Tratamento | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Total |
|------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| T15 | 17,75±3,03 | 11,58±0,76 ^a | 13,83±3,26 ^a | 16,08±4,0 ^a | 59,25±2,61 ^a |
| T20 | 18,08±3,50 | 15,0±1,32 ^{ab} | 15,75±0,66 ^{ab} | 22,33±2,32 ^{ab} | 71,16±2,62 ^{ab} |
| T25 | 18,5±1,50 | 22,08±4,09 ^{ab} | 28,16±5,39 ^b | 26,51±10,82 ^b | 95,26±20,52 ^c |
| T30 | 23,5±3,14 | 19,91±4,65 ^{ab} | 20,5±2,38 ^{ab} | 19,33±3,84 ^a | 83,25±15,50 ^{bc} |
| T35 | 21,7±4,18 | 22,91±10,43 ^b | 18,5±1,14 ^{ab} | 13,58±2,50 ^a | 76,7±7,00 ^{bc} |

Figura 5 - Média (n=4) e desvio padrão da taxa de eclosão de ovos de *B. similis* durante o período de três dias. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).



28 DISCUSSÃO

A salinidade é um dos fatores mais importantes em relação a distribuição de organismos marinhos devido a faixa de tolerância de cada espécie decorrente da sua capacidade de osmorregulatória (CERVETTO et al., 1999). Náuplios e adultos de *B. similis* se mostraram resistente às variações abruptas da salinidade no presente trabalho, dentro do intervalo de até $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, o que corrobora as observações de estudos que verificaram maior tolerância à variação da salinidade de copépodes costeiros e estuarinos (CHINNERY; WILLIAMS, 2004; RHYNE et al., 2010). Cervetto et al. (1999) observaram resultados semelhantes para a espécie *A. tonsa*, que se adaptou bem à variação abrupta da salinidade em um intervalo de até $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, porém a espécie apresentou maior sensibilidade com a elevação da salinidade, o que difere dos resultados observados para *B. similis*, em que o copépode se mostrou mais tolerante à elevação da salinidade.

Apesar da temperatura ser o principal parâmetro ambiental correlacionado com o tempo de desenvolvimento de copépodes (MAUCLINE, 1998; DUSSART; DEFAYE, 2001; PETERSON, 2001; CHINNERY; WILLIAMS, 2004), alguns trabalhos sugerem que a salinidade também pode ter influência sobre este índice zootécnico (CHINNERY; WILLIAMS, 2004; MILIONE; ZENG, 2008; RHYNE et

al.,2010). No presente trabalho foi possível verificar que o período de desenvolvimento de náuplios até a fase adulta foi influenciado pela salinidade, sendo mais curto para as salinidades intermediárias (20 a 30 g . L⁻¹), em comparação as salinidades de 15 e 35 g . L⁻¹. Outros autores também verificaram que em salinidades intermediárias (20 a 30 g . L⁻¹) copépodes das espécies *Gladioferens imparipes*, *Pseudodiaptomus pelagicus* e *Acartia* sp., atingiram a maturação em um menor período (PAYNE; RIPPINGALE, 2001; CHINNERY; WILLIANS, 2004; RHYNE et al., 2010). As diferenças observadas no desenvolvimento de copépodes em função da alteração da salinidade pode estar relacionada com o gasto energético do transporte ativo de íons, envolvendo a degradação de compostos como lipídios e proteínas nos processos de osmoregulação, podendo inclusive afetar a qualidade nutricional dos náuplios (PHELPS et al., 2005). Populações diferentes da mesma espécie ainda podem se adequar a faixas de salinidade distintas, como resultado de transformações progressivas da sua tolerância fisiológica (CERVETTO et al., 1999).

A salinidade não influenciou na composição populacional e na sobrevivência de *B. similis* no presente estudo. O efeito da salinidade na sobrevivência de copépodes calanoida parece não apresentar um padrão bem definido quando analisamos alguns estudos já realizados em laboratório (CERVETTO et al., 1999; CHINNERY; WILLIANS, 2004; CHEN et al., 2006; RHYNE et al., 2010). A influência da salinidade pode estar relacionada ao efeito espécie específico e ao habitat das populações de copépodes estudadas. Segundo Castro-Longoria (2003) é difícil determinar a faixa adequada de salinidade para espécies estuarinas, pois cada espécie pode se adaptar a diferentes salinidades nos seus diferentes estágios de maturação. Rhyne et al. (2010) observaram elevada sobrevivência para *P. pelagicus* no intervalo entre 15 e 20 g . L⁻¹, mas houve queda da sobrevivência com o aumento ou diminuição da salinidade fora desse intervalo. Chen et al. (2006) observaram melhor sobrevivência para *P. annandaei* em salinidades mais baixas, entre 5 e 10 g . L⁻¹, e verificaram o aumento da mortalidade com a elevação da salinidade. Chinnery e Willians (2004) observaram melhor sobrevivência para quatro espécies de *Acartia* sp. em salinidades mais próximas da densidade da água do mar, 33.3 g . L⁻¹, com queda da sobrevivência conforme o decréscimo da salinidade.

A salinidade também pode influenciar na fecundidade de copépodes calanoida, ocorrendo uma queda na produção de ovos quando os animais são mantidos em níveis sub-ótimos (CASTRO-LONGORIA,

2003; CHENG et al., 2006; PECK; HOLSTE, 2006). Segundo Peck e Holste (2006), a relação entre a salinidade e a produção de ovos também pode estar relacionada ao custo energético para a osmoregulação, por isso, é importante encontrar a faixa adequada de salinidade para cada espécie de copépode, pois ao mantermos copépodes adultos em salinidades adequadas, mais energia pode ser direcionada para o processo reprodutivo. No presente estudo verificamos que a fecundidade total por fêmea na salinidade de 25 g . L⁻¹ (T₂₅) foi superior à fecundidade observada em 15 e em 20 g . L⁻¹. Porém, ao observarmos alguns estudos, podemos verificar que a faixa ótima de salinidade para produção de ovos em copépodes calanoida também pode variar conforme a espécie analisada. No estudo de Peck e Holste (2006), os autores verificaram que a produção de ovos para o copépode *Acartia tonsa* foi superior na salinidade 14 g . L⁻¹ quando comparada com a produção em 30 g . L⁻¹. Lin et al. (1998) também observaram uma maior fecundidade para o copépode *Acartia spinicauda* em baixa salinidade, 17 g . L⁻¹. Já Payne e Rippingale (2001) ao avaliarem a salinidade na faixa de 9 a 35 g . L⁻¹ observaram uma maior produção de ovos para o copépode *Gladioferens imparipes* quando este foi mantido em salinidades intermediárias de 18 a 27 g . L⁻¹. Cheng et al. (2006) verificaram a queda na produção de ovos do copépode *Pseudodiaptomus annandalei* apenas nas salinidades de 30 e 35 g . L⁻¹. A salinidade ainda pode ter um efeito indireto sobre o crescimento e a reprodução dos copépodes em laboratório através do efeito exercido sobre o fitôplankton, alterando seu crescimento e composição bioquímica e consequentemente modificando sua densidade e o perfil nutricional (BRAND, 1983; FABREGAS et al., 1985).

Segundo Milione e Zeng (2008), o efeito da salinidade na eclosão de ovos de copépodes calanoida é menos evidente quando comparado ao da fecundidade, o que está de acordo com os resultados observados no presente estudo. Ao avaliar o efeito da salinidade em quatro espécies do gênero *Acartia* (*A. discaudata*, *A. clausi*, *A. tonsa* e *A. bifilosa*), Chinnery e Williams (2004) também verificaram que salinidades entre 15,5 e 33,3 g . L⁻¹ não afetaram a taxa de eclosão, que se manteve elevada em todos os tratamentos.

Apesar dos copépodes costeiro e estuarinos possuírem a capacidade de se adaptar a uma ampla faixa de salinidade, ainda é importante se determinar a faixa ótima para maximizar o desempenho zootécnico, melhorando assim a eficiência da produção e reduzindo custos.

29 CONCLUSÃO

A salinidade afetou a reprodução e o desenvolvimento do copépode *B. similis*. Através dos resultados do presente estudo foi possível observar que a produção do copépode em salinidades de 25 a 35 g . L⁻¹ resultou em melhores índices zootécnicos, como maior taxa de fecundidade por fêmea e menor período de desenvolvimento de náuplios até adultos. Porém a salinidade não afetou a sobrevivência, a composição populacional, a proporção sexual e a taxa de crescimento populacional de *B. similis* dentro do intervalo de 15 a 35 g . L⁻¹. A espécie também se mostrou resistente à variação abrupta da salinidade para uma ampla faixa, apresentando elevada sobrevivência no intervalo de 5 a 50 g . L⁻¹, para adultos e de 10 a 45 g . L⁻¹, para náuplios.

30 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e aos funcionários do LMM-UFSC, do LAPOM-UFSC e do LAPMAR-UFSC pelo suporte técnico.

31 REFERÊNCIAS

Brand, Larry E. 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Est. Coast.and Shelf Sci*, 18.5: 543-556.

Camus, T., Zeng, C., 2008. The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 287, 145–151.

Camus, T., Zeng, C., McKinnon, A. D., 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture* 297, 169–175

Castro-Longoria, E., 2003. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. *J Crustacean Biol*, 23(2), 289-299.

Cervetto, G., Gaudy, R., Pagano, M., Saint-Jean, L., Verriopoulos, G., Arfi, R., Leveau, M., 1993. Diel variations in *Acartia tonsa* feeding,

respiration and egg production in a Mediterranean coastal lagoon. *J Plankton Res* 15(11), 1207-1228.

Chen, Q., Sheng, J., Lin, Q., Gao, Y., Lv, J., 2006. Effect of salinity on reproduction and survival of the copepod *Pseudodiaptomus annandalei* Sewell, 1919. *Aquaculture* 258(1), 575-582.

Chinnery, F. E., Williams, J. A., 2004. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology* 145, 733-738.

Conceicao, L. E., Yufera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M. T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquac. Res.* 41, 613-640.

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A.K., Hansen, B., 2011. W. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed *Aquaculture* 315, 155-166.

Dussart, B. H. and Defaye, D., 2001. Introduction to the Copepoda. In Dumont, H. J. (ed.), *Guides to the Identification of the Macroinvertebrates of the Continental Waters of the World*. 16. Backhuys, Leiden, p. 344.

Evjemo, J. O., Reitan, K. I., Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227, 191-210

Fábregas, Jaime, et al. 1985. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50.1-2, 1-11.

Gaudy, R., Cervetto, G. and Pagano, M., 2000. Comparison of the metabolism of *Acartia clausi* and *A. tonsa*: influence of temperature and salinity. *J Exp Mar Biol Ecol* 247(1), 51-65.

Holste, L., Peck, M., 2006. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Mar. Biol.* 148, 1061-1070.

James, C. M., Al-Khars, A. M., 1986. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. *Syllogeus* 58, 333-340.

- Kaminski, S. M., Bersano, J. G., Amaral, W. J. A. 2009. Efeitos da salinidade e dieta alimentar sobre os copépodos *Pseudodiaptomus richardi* e *Notodiaptomus incompositus* em estudos de laboratório. Brazil J of Aquatic Sci Tech 13.(1), 25-36.
- Kline, M. D., Laidley, C. W., 2015. Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: Optimizing adult density. Aquaculture 435, 128-136.
- Knuckey, R. M., Semmens, G. L., Mayer, R. J., Rimmer, M. A., 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. Aquaculture 249, 339-351.
- Lampert, W., Sommer, U., 1997. Limnology: the ecology of lakes and streams. New York: Oxford University.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Technical Papers 361. FAO, Rome, Italy, 295pp.
- Lemus, J. T., Blaylock, R. B., Apeitos, A., Lotz, J. M., 2010. Short-term effect of first prey type and number on survival and growth of intensively cultured Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae), larvae. J. World Aquac. Soc. 41, 455-463.
- Lin, L.M., Xu, F., Lin, J., 1998. The effect of various salinity on the growth and development of *Acartia spinicauda*. J Oceanogr Taiwan Strait 17, 53-55.
- Mauchline, J., 1998. Advances in marine biology -The biology of calanoid copepods. Adv Mar Biol 33. p. 710.
- McAllen, R., Taylor, A., 2001. The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. J Exp Mar Biol Eco 263, 227-240.
- McEvoy, L. A., Estevez, A., Bell, J. G., Shields, R. J., Gara, B., Sargent, J. R., 1998. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acid on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Bull. Aquacult. Assoc. Can 98, 17-20.
- McKinnon, A. D., Duggan, S., 2001. Summer egg production rates of paracalanid copepods in subtropical waters adjacent to Australia's North West Cape. Hydrobiologia 453(1), 121-132.

- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., Robino, B., 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223, 89-106.
- Milione, N., Zeng, C., 2008. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 275, 116-123
- Ohs, C. L., A. L. Rhyne, S. W. Grabe, M. A. DiMaggio, Stenn E., 2010. Effects of salinity on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture* 307, 219-224.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M., Carnevali, O., 2005. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture* 250(1), 175-182.
- Ostrowski, A. C., Laidley, C. W., 2001. Application of marine foodfish techniques in marine ornamental aquaculture: Reproduction and larval first feeding. *Aquarium Sci Conserv* 3(1-3), 191-204.
- Payne, M. F., Rippingale, R. J., 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201, 329-342.
- Payne, M., 2000. Cultured copepods as live food for fish. In: McKinnon, D., Rimmer, M., Kolkovski, M. (Eds.), *Hatchery Feeds: Proceedings of a workshop held in Cairns, 9-10 March 2000*, p. 57-62.
- Peck, M. A.; Holste, L., 2006. Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): optimizing intensive cultures. *Aquaculture* 255(1), 341-350.
- Peterson, W. T., 2001. Patterns in stage duration and development among marine and freshwater calanoid and cyclopoid copepods: a review of rules, physiological constraints, and evolutionary significance. *Hydrobiologia* 453-454, 91-105.
- Phelps, R.P., Sumiarsa, G.S., Lipman, E.E., Lan, H.P., Moss, K.K., Davis, A.D., 2005. Intensive and extensive production techniques to provide copepod nauplii for feeding larval red snapper *Lutjanus campechanus*. In: Lee, C.-S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Scientific Publications Ltd, Melbourne, p. 151-168.

- Rhyne, A. L., Ohs, C. L., Stenn, E., 2009. Effects of temperature on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture* 292(1), 53-59.
- Sampey, A., McKinnon, A. D., Meekan, M. G., McCormick, M. I., 2007. Glimpse into guts: overview of the feeding of larvae of tropical shorefishes. *Mar Ecol Prog Ser* 339, 243–257.
- Sargent, J. R., Falk-Petersen, S., 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. In *Biology of Copepods*. Springer Netherlands, p. 101-114.
- Schipp, G. R., Bosmans, J. M., Marshall, A. J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174(1), 81-88.
- Schipp, G., 2006. The use of Calanoid copepods in semiintensive, tropical marine fish larviculture. En: Editores: Cruz Suárez LE, Marie DR, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Ortega AG. *Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 15–17 November. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, p. 84–94.
- Souza-Santos, L. P., Pastor, J. M., Ferreira, N. G., Costa, W. M., Araújo-Castro, C., Santos, P. J., 2006. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. *Aquaculture Res* 37(15), 1516-1523.
- Støttrup, J. G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Res* 31(8-9), 703-711.
- Støttrup, J. G., 2003. Production and nutritional value of copepods. In: Støttrup JG, McEvoy LA (eds) *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell, Oxford, p. 318.
- Toledo, J. D., Golez, M. S., Doi M., Ohno, A., 1999. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Sci* 65, 390–397.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS E DA CONCENTRAÇÃO DE ALIMENTO NO CRESCIMENTO DO PROTOZOÁRIO CILIADO *Euplotes* sp.

Wesley Freitas da Anunciação^{a*}; Carter Cyr^b; Mônica Yumi Tsuzuki^a;
Cortney Ohs^b

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura,
Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos, Servidão dos Coroas
503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.

^b University of Florida. IRREC-IFAS. Fort Pierce, FL. USA

*wannunciacao@gmail.com

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Aquaculture*
(A2, Fator de impacto: 1.878)

32 RESUMO

Elevados índices de mortalidade são observados na larvicultura de peixes marinhos, principalmente na fase inicial em que ocorre a transição da alimentação endógena para exógena. Várias espécies de peixes marinhos não são aptas a se alimentarem dos alimentos vivos tradicionalmente utilizados na aquicultura, como rotíferos e artêmia, o que pode resultar em baixo crescimento e sobrevivência das larvas. Ciliados são uma alternativa como alimento potencial para complementar a primeira alimentação de larvas, pois alcançam elevadas densidades, aceitam dietas inertes e são encontrados no ambiente natural de larvas de diversas espécies de peixes marinhos. Devido à escassez de trabalhos investigando a produção massiva de ciliados em laboratório foram realizados cinco experimentos para avaliar o efeito da salinidade (15, 20, 25, 30, e 35 g . L⁻¹); fotoperíodo (0L : 24E, 8L : 16E, 12L : 12E, e 24L : 0E); temperatura (17, 20, 23, 26, 29, e 32 °C); aeração (0, 8.5, 20, e 100 cm³ de ar . minuto⁻¹); e também de diferentes concentrações de alimento (50, 100, 250, e 500 mg de Protein Selco® . 10⁻⁶ células de ciliado) no crescimento de *Euplotes* sp. Os animais foram estocados na densidade de 25 . células . mL⁻¹, em unidades experimentais com 750 mL de água marinha e alimentados com produto comercial Protein Selco® (Inve co.). O aumento da concentração de alimento, temperatura e salinidade apresentaram uma correlação positiva com o crescimento. O aumento da taxa de aeração influenciou negativamente o crescimento da população do ciliado *Euplotes* sp., enquanto o fotoperíodo 0L : 24E (ausência de luz) apresentou maior taxa de crescimento específico em relação ao fotoperíodo 24L : 0E (iluminação contínua) porém não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) entre os fotoperíodos intermediários 8L : 16E e 16L : 8E. A população de *Euplotes* sp. apresentou grande crescimento populacional, chegando a alcançar 5,34 . 10³ . células . mL⁻¹. Através dos resultados observados no presente estudo, podemos considerar a faixa adequada na produção de *Euplotes* sp. para temperatura entre 26 a 32 °C; salinidade entre 20 e 35 g . L⁻¹, concentração de alimento de 250 mg . 10⁶ células⁻¹; devem ser mantidos com baixos níveis ou ausência de aeração e com fotoperíodo entre 0L : 24E e 16L : 8E.

Palavras-chave: *Euplotes* sp. Aquicultura. Protozoário ciliado. Parâmetros abióticos.

33 ABSTRACT

High mortality rates are observed in larvae of marine fish, particularly in the initial stages where occurs the transition from endogenous to

exogenous feeding. Several species of marine fish are not able to feed on traditionally live feeds used in aquaculture, such as rotifers and brine shrimp, which can result in poor growth and low survival of larvae. Ciliates are a potential alternative as a supplementary food for the first larval feeding. They have the advantage to reach at high densities, accept inert diets and are found in the natural environment of several species of marine fish. Due to the lack of studies investigating the mass production of ciliates in the laboratory were conducted five experiments to evaluate the effect of salinity (15, 20, 25, 30, and 35 g L⁻¹); photoperiod (0L: 24D, 8L: 16D, 12L: 12D and 24L: 0D); temperature (17, 20, 23, 26, 29, and 32 ° C); aeration (0, 8.5, 20, and 100 mL . air . minute⁻¹); and also different food concentrations (50, 100, 250, and 500 mg of Protein Selco® . 10⁶ ciliated cells) on the growth of ciliate *Euplotes* sp. The animals were stocked in 25. cells. ml⁻¹ inside the experimental units with 750 ml of seawater and fed with commercial products Protein Selco © (Inve co.). The Increase in the feed concentration, temperature and salinity was positively correlated with growth. Increased aeration rate negatively influenced the population growth of *Euplotes* sp., while the photoperiod 0L : 24D (no light) demonstrate a higher specific growth rate in relation to photoperiod 24L : 0D (continuous lighting) but no significant difference (p> 0.05) was observed between the intermediary photoperiod 8L : 16D and 16L : 8D. The population showed a high population growth, reaching to 5.34. 10³. cells. mL⁻¹. Through the results observed in this study, we can consider the proper range to produce *Euplotes* sp. the temperature between 26 and 32 ° C; salinity between 20 and 35 g. L⁻¹, feed concentration of 250 mg. 10⁶ cells⁻¹; and should be kept at low levels or absence of aeration and photoperiod between 0L: 0D and 16L: 8D.

Keywords: *Euplotes* sp. Aquaculture. Ciliate protozoa. Abiotics parameters.

34 INTRODUÇÃO

A larvicutura é uma das etapas mais delicadas na produção de peixes marinhos (BELL et al., 2003), onde são observados elevados índices de mortalidade, principalmente na fase de transição da

alimentação endógena para exógena (OLIVOTTO et al., 2008). Para contornar esse problema faz-se necessária a utilização de dietas adequadas, compostas por alimentos vivos que atendam o perfil nutricional das larvas, possuam tamanho e padrão de natação adequados. No ambiente natural, a alimentação inicial das larvas de peixes marinhos é composta por uma vasta gama de alimentos como, ciliados, apendiculários, larvas de moluscos, náuplios e ovos de copépodes (HOLT; HOLT, 2000; RILEY; HOLT, 1993). Porém, dentro da produção aquícola, o alimento fornecido às larvas é basicamente limitado ao uso de rotíferos e artêmia, que muitas vezes, não são adequados para suportar o desenvolvimento das larvas de diversas espécies de peixes marinhos com importância comercial (HOLT, 2003).

Entre os alimentos vivos alternativos, os protozoários ciliados são considerados por diversos autores como um alimento potencial para complementar a primeira alimentação de larvas de peixes marinhos (NAGANO et al., 2000a; NAGANO et al., 2000b; OLIVOTTO et al., 2005; MOORHEAD; ZENG, 2010). Estes organismos possuem a vantagem de alcançarem elevadas densidades (YOO; HUR, 2002; UYE et al., 1996), aceitam dietas inertes (CÔRTEZ; TSUZUKI; MELO, 2013), são encontrados no ambiente natural das larvas (FUKAMI et al., 1999; HOLT; HOLT, 2000; FIGUEIREDO et al., 2007) e várias espécies ainda possuem tamanho similar ou menor aos náuplios de copépodes (TANIGUCHI, 1977; NAGANO et al., 2000a). Aliado a esse fato, podemos considerar que diversas espécies de peixes marinhos possuem uma boca pequena e uma baixa atividade natatória, o que favoreceria o consumo de algumas espécies de ciliados (UYE et al., 1996; HUNT VON; HERBING; GALLAGER, 2000).

Em diversos ambientes costeiros, a abundância de protozoários ciliados é, muitas vezes, superior à de copépodes (KAMIYAMA, 1994; UYE et al., 1996) e já foram descritas diversas espécies de larvas que se alimentam de ciliados, entre elas a anchova *Engraulis encrasicolus* (ROSSI et al., 2006) e a sardinha *Clupea harengus* (FIGUEIREDO et al., 2005). Fukami et al. (1999) encontram protistas no trato digestório de larvas de peixes de 42 grupos taxonômicos diferentes e Figueiredo et al. (2007) estimaram que os protozoários podem representar pelo menos 25 % da dieta de 6 espécies de peixes marinhos. A alimentação inicial de larvas de peixes marinhos com ciliados pode contribuir para prevenir um período prolongado de inanição evitando que as mesmas cheguem à um ponto irreversível, o que resultaria em elevada mortalidade (RHODES; PHELPS, 2008).

Entre os ciliados aloricados se encontra o gênero *Euplotes* sp, sendo que a maioria das espécies se alimentam principalmente de bactérias. Alguns estudos têm utilizado este gênero de ciliado na larvicultura de peixes marinhos, como complemento ao uso de rotíferos e copépodes, sendo observado em vários deles um resultado positivo na sobrevivência das larvas. Nagano et al. (2000a) e Nagano et al. (2000b) observaram que larvas de garoupa, *Epinephelus septemfasciatus*, e do peixe cirurgião, *Paracanthurus hepatus*, puderam capturar o ciliado *Euplotes* sp. logo após a absorção do saco vitelínico e apresentaram maior sobrevivência durante os primeiros dias de larvicultura nos tratamentos com elevadas concentrações de ciliados. Olivotto et al. (2005) e Madhu e Madhu (2014) também observaram maior sobrevivência para o gobídeo *Gobiosoma evelynae* e para o “firefish”, *Nemateleotris decora*, respectivamente, quando alimentados com *Euplotes* sp., em comparação com animais alimentados apenas com os rotíferos *Brachionus rotundiformes* e *B. plicatilis*.

Apesar da importância de protozoários na cadeia alimentar de peixes marinhos já ter sido constatada ainda existem poucos estudos investigando técnicas e aspectos do desenvolvimento da produção massiva de protozoários na aquicultura (MOORHEAD; ZENG, 2010; MONAGNES, DOWER; FIGUEIREDO et al., 2010).

Devido à escassez de trabalhos investigando a produção de ciliados em laboratório (PANDEY; YERAGI, 2004; MOORHEAD; ZENG, 2010), o presente estudo se propôs a avaliar a influência dos fatores abióticos, salinidade; fotoperíodo; temperatura; aeração e também de diferentes concentrações de alimento no crescimento de *Euplotes* sp.

35 MATERIAL E MÉTODOS

35.1 LOCAL EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS

A cultura de *Euplotes* sp. foi inicialmente isolada a partir de tanques de produção de copépodes, no Indian River Research and Education Center Aquaculture Facility (IRREC-IFAS); University of Florida; Fort Pierce, EUA, e mantida em 12 tubos de ensaio de 15 mL. Os tubos de ensaio foram armazenados em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C (Média \pm DP), salinidade 30 g . L⁻¹ e fotoperíodo natural. Duas semanas após a coleta e isolamento, os protozoários foram transferidos gradativamente para recipientes de 5 e 25 L. A água utilizada na manutenção das culturas passava por uma filtragem mecânica, através

de filtro com 10 μm , e tratamento ultravioleta (90w). Depois desse processo, a água era esterilizada com o uso de cloro, neutralizado com tiosulfato de sódio. Os organismos foram alimentados com uma mistura de Algamac 3050® e Protein Selco® (Inve co.) (1:1) na concentração de $0,5 \text{ g} \cdot 10^{-6} \cdot \text{células de ciliado}$.

35.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para a realização dos experimentos foram utilizados béqueres de plástico como unidades experimentais, contendo 750 mL de água marinha, salinidade $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (exceto para o experimento 2), com cinco réplicas por tratamento. Para minimizar a evaporação de água, os béqueres eram cobertos com uma tampa e diariamente era feita a correção da salinidade nas unidades experimentais, caso necessário.

O produto comercial Protein Selco® (Inve co.), escolhido com base nos resultados de pré-testes previamente realizados, foi utilizado para a alimentação dos animais na concentração de $250 \text{ mg} \cdot 10^{-6} \cdot \text{células}^{-1}$ de ciliados, com exceção do experimento 1 (item 35.3). Diariamente, o alimento era pesado, diluído em um volume predeterminado de água marinha e processado no liquidificador durante dois minutos. Após esse procedimento, a solução era filtrada em uma peneira com malha de 23 micras e fornecida aos ciliados, de acordo com a dosagem necessária, baseada na contagem diária do número de células de *Euplotes* sp.

Para a determinação diária do número de células ao longo dos experimentos, o conteúdo das unidades experimentais era homogeneizado e eram coletadas três amostras de 15 mL de cada uma das unidades. Essas amostras coletadas foram fixadas em formalina 5% e trinta sub-amostras de 250 μL foram utilizadas para a quantificação do número de células, para cada tratamento, com auxílio de um microscópio estereoscópio. Todos os dias foram monitorados os parâmetros de qualidade de água, amônia total (teste colorimétrico API®), temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade (multiparâmetro).

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado durante o período de sete dias (experimentos 1, 2 e 3) e de oito dias (experimentos 4 e 5). A densidade de estocagem inicial utilizada nos experimentos foi de 25 ciliados. mL^{-1} .

35.3 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALIMENTO (C) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes sp.*

Para determinar o efeito das concentrações de alimento no crescimento de *Euplotes sp.* foram utilizado quatro tratamentos: 50 (CA₅₀); 100 (CA₁₀₀); 250 (CA₂₅₀) e 500 (CA₅₀₀) mg de Protein Selco® (Inve co.) . 10⁻⁶ células de ciliado, seguindo o protocolo de alimentação previamente descrito. As unidades experimentais foram mantidas em banho maria, dotadas de leve aeração (8,5 cm³ de ar . minuto⁻¹), em sala climatizada com temperatura controlada (24 ± 1 °C) e fotoperíodo de 24L : 0E.

35.4 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SALINIDADES (S) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes sp.*

Animais oriundos dos tanques de produção, foram previamente aclimatados com uma variação máxima diária na salinidade de 3 g . L⁻¹, até se obter a salinidade desejada. Após o período de 10 dias, os ciliados foram estocados nas unidades experimentais, de acordo com as respectivas salinidades avaliadas, 15 (S₁₅); 20 (S₂₀); 25 (S₂₅); 30 (S₃₀) e 35 g . L⁻¹ (S₃₅). As unidades experimentais eram dotadas de leve aeração (8,5 cm³ de ar . minuto⁻¹) e mantidas em banho maria, em sala climatizada com temperatura controlada (27 ± 1°C) e fotoperíodo de 24L : 0E. A correção da salinidade era realizada diariamente durante o processo de alimentação, caso houvesse uma variação superior a 1 g . L⁻¹ nas unidades experimentais.

35.5 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS (T) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes sp.*

Foram utilizados seis tratamentos, 17 (T₁₇); 20 (T₂₀); 23 (T₂₃); 26 (T₂₆); 29 (T₂₉) e 32 (T₃₂) °C, para avaliar o efeito da temperatura no crescimento do ciliado *Euplotes sp.* Para se obter um controle mais rigoroso da temperatura, o experimento foi realizado em câmaras de incubação, com umidade (70%), temperatura e fotoperíodo (24L : 0E) controlados. As unidades experimentais eram dotadas de leve aeração e mantidas em banho maria, dentro de caixas plásticas que ficavam no interior das incubadoras.

35.6. EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (TA) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp.

Para avaliar o efeito da taxa de aeração sobre o crescimento dos ciliados foram utilizados quatro tratamentos: 0 (TA₀, zero), 8.5 (TA_{8.5}, leve), 20 (TA₂₀, moderada) e 100 (TA₁₀₀, alta) cm³ de ar . minuto⁻¹. O fluxo de ar foi determinado através da quantificação do intervalo de tempo necessário para que a aeração deslocasse um volume pré-determinado de água destilada (2mL). Os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura de 26,4 ± 0,3 °C e fotoperíodo de 24L : 0E. A aeração era introduzida nas unidades experimentais através de pipetas de 1 mL, presa no centro dos béqueres.

35.7 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS (F) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp.

O efeito do fotoperíodo foi avaliado através de quatro diferentes tratamentos: 0L : 24E (F_{0:24}); 8L : 16E (F_{8:16}); 12L : 12E (F_{12:12}) e 24L : 0E (F_{24:0}). Para isolar os diferentes tratamentos foram utilizadas quatro câmaras escuras, com base plástica e revestidas com dupla camada de lona preta. A iluminação era feita com o uso de lâmpadas fluorescentes de 11w, com intensidade luminosa de 650 lux, medidos na superfície da água (luxímetro Aquatic EcoSystems®, SM700). As unidades experimentais eram dotadas de leve aeração e todas as câmaras escuras ficavam em banho maria, dentro de um tanque de fibra, em sala climatizada com temperatura de 28 ± 0.6 °C.

35.8 TAXA DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento específico da população (K) foi calculada através da fórmula (OHMAN; SNYDER, 1991):

$$K = \frac{(\ln N_T - \ln N_0)}{T}$$

Onde T é período de crescimento (em dias), N_T é densidade da população final e N₀ a densidade da população inicial (número de células). Também foi calculado o tempo de duplicação da população (T_D) dividindo-se o log_e2 pela taxa de crescimento específico da população (K) (JAMES; AL-KHARS, 1986):

$$T_D = \frac{\text{Log}_e 2}{K}$$

35.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de crescimento populacional foram submetidos à análise de regressão não linear e a Análise de Variância para medidas repetidas (ANOVA), para comparação das médias. As taxas de crescimento específico, tempo de duplicação, e os parâmetros de qualidade da água foram avaliados através da Análise de Variância Unifatorial (ANOVA). Diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o software Statsoft Statistica 10.0®. A normalidade da distribuição da amostra foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedacidade dos dados foi avaliada pela prova de Levene. A transformação Box Cox foi utilizada caso houvesse a necessidade de se obter a homocedasticidade na análise de variação.

36 RESULTADOS

36.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALIMENTO (CA) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp.

A concentração de alimento influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de *Euplotes* sp., Figura 1 e Tabela 1. A partir do terceiro dia verificou-se uma diferença mais acentuada do crescimento populacional, com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população de T₂₅₀ e T₅₀₀ em relação a T₅₀ e T₁₀₀. No fim do período experimental o crescimento populacional, a taxa de crescimento específico e a taxa de duplicação da população de CA₂₅₀ e CA₅₀₀ também foram superiores ($p < 0,05$) às do T₅₀ e T₁₀₀.

No fim do experimento ocorreu o acentuado declínio dos níveis de oxigênio e pH nos tratamentos de maior concentração de alimento, CA₂₅₀ e CA₅₀₀ (Tabela 2). Nesses tratamentos também pudemos verificar, após o quinto dia de experimento, o aumento do material particulado em suspensão e a aparência leitosa da água dentro das unidades experimentais. Os níveis de oxigênio e pH não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos no início do experimento e variaram de $5,1 \pm 0,15$ a $5,7 \pm 0,56$ mg . L⁻¹ e $7,42 \pm 0,28$ a $7,60 \pm 0,06$ respectivamente.

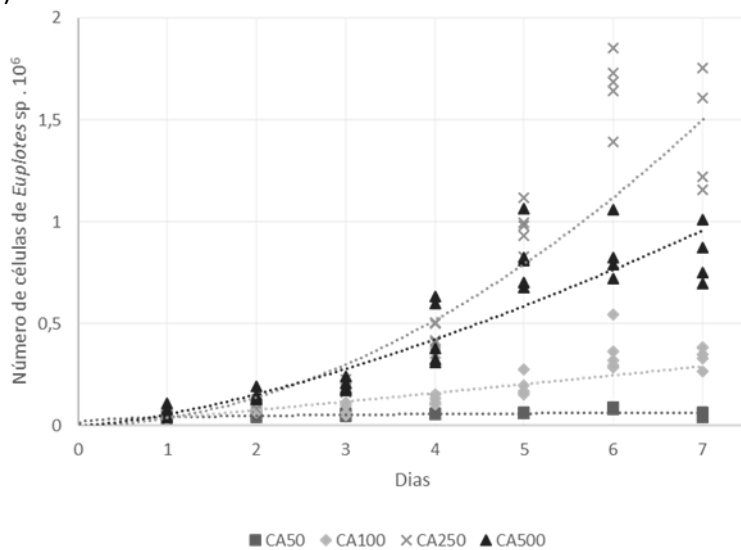
Tabela 1

Equações das curvas de regressão e coeficiente de correlação para o crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes concentrações de alimento (Figura 1 A).

| Tratamento | Equação | R ² |
|-------------------|-----------------------|----------------|
| CA ₅₀ | $y = 40082x^{0,282}$ | 0,4845 |
| CA ₁₀₀ | $y = 36845x^{1,0631}$ | 0,816 |
| CA ₂₅₀ | $y = 37010x^{1,9126}$ | 0,930 |
| CA ₅₀₀ | $y = 56273x^{1,4568}$ | 0,907 |

Figura 1 – A -Curva de crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes concentrações de alimento (CA). B – Variação da população final de *Euplotes* sp

A)



B)

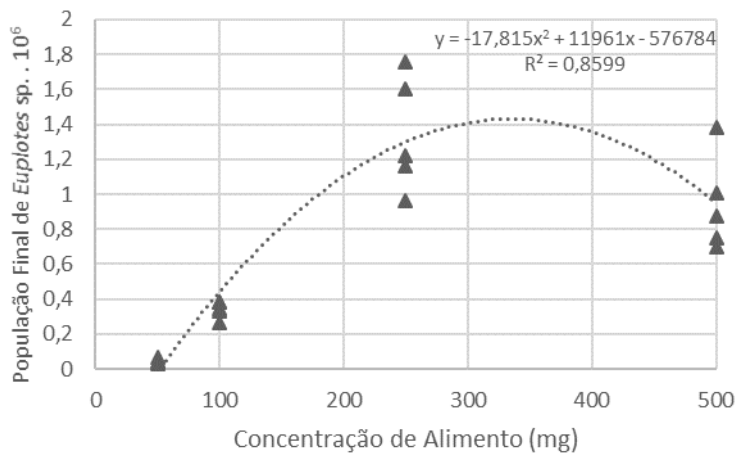


Tabela 2

Média (n=5) e desvio padrão da taxa de crescimento específico (K); tempo de duplicação da população (T_D), em dias; oxigênio; pH e amônia tóxica, para diferentes concentrações de alimento. Os dados para oxigênio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), pH e amônia tóxica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) representam os parâmetros observados no último dia de experimento. Dados para amônia tóxica representam o intervalo médio observado no teste colorimétrico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

| Tratamento | K | T_D | Oxigênio | pH | Amônia Tóxica |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| CA ₅₀ | 0,057±0,017 ^a | 13,10±5,680 ^a | 5,437±0,135 ^a | 7,667±0,069 ^a | 0,006 |
| CA ₁₀₀ | 0,372±0,021 ^b | 1,865±0,119 ^b | 4,285±0,386 ^b | 7,450±0,029 ^b | 0,006 |
| CA ₂₅₀ | 0,565±0,035 ^c | 1,229±0,077 ^c | 1,810±0,468 ^c | 7,045±0,054 ^c | 0,011 |
| CA ₅₀₀ | 0,514±0,038 ^c | 1,353±0,982 ^c | 0,65±0,282 ^d | 6,932±0,135 ^c | 0,022 |

36.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA SALINIDADE (S) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp

A salinidade não influenciou o crescimento do ciliado *Euplotes* sp. na maior parte do espectro avaliando, sendo que, apenas no S₁₅ foi observado um menor crescimento ($p < 0,05$), em relação aos demais tratamentos (Figura 2; Tabelas 3 e 4). O tempo de duplicação variou entre 0,892 e 1,06 dias e também apresentou um melhor resultado ($p < 0,05$) no intervalo entre 20 e 35 g . L⁻¹ em relação a salinidade de 15 g . L⁻¹(tabela 4). A maior densidade populacional média observada ao final do experimento foi de 4,34 . 10⁶ células . L (S₂₅), enquanto a menor foi de 2,65 . 10⁶ células . L (S₁₅).

Os níveis de oxigênio ao final do experimento se mantiveram abaixo de 1 mg . L⁻¹ em todos os tratamentos e a amônia total foi superior a 8 mg . L⁻¹ para o S₂₀, S₂₅, S₃₀ e S₃₅, tabela 4. A média dos parâmetros de qualidade da água não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) no início do experimento, com oxigênio variando entre 6,02 ± 0,07 e 6,25 ± 0,56 mg . L⁻¹, pH de 7,74 ± 0,06 a 7,82 ± 0,02, e amônia total 0 mg . L⁻¹.

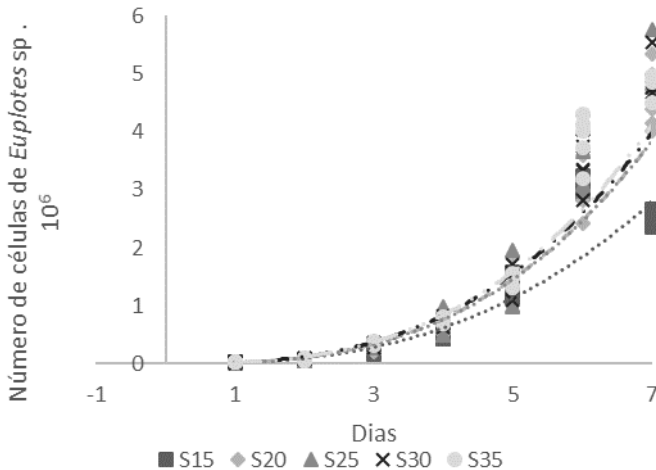
Tabela 3

Equações das curvas de regressão e coeficiente de correlação para o crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes salinidades.

| Tratamento | Equação | R ² |
|-----------------|-----------------------|----------------|
| S ₁₅ | $y = 11081x^{2,6945}$ | 0,955 |
| S ₂₀ | $y = 10851x^{2,8693}$ | 0,966 |
| S ₂₅ | $y = 10316x^{2,9113}$ | 0,953 |
| S ₃₀ | $y = 12997x^{2,795}$ | 0,975 |
| S ₃₅ | $y = 12426x^{2,8341}$ | 0,960 |

Figura 2 – A) Curva de crescimento da população de *Euplotes* sp em diferentes salinidades. B) Variação da população final de *Euplotes* sp.

A)



B)

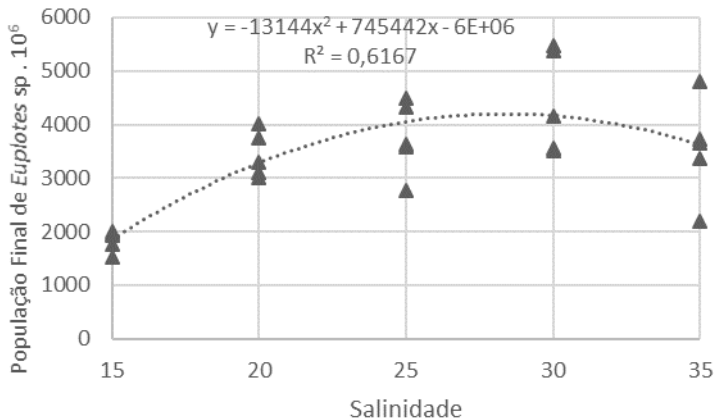


Tabela 4

Média (n=5) e desvio padrão da taxa de crescimento específico (K); tempo de duplicação da população (T_D), em dias; oxigênio; pH e amônia total, para diferentes salinidades. Os dados para oxigênio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), pH e amônia tóxica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) representam os parâmetros observados no último dia de experimento. Dados para amônia tóxica representam o intervalo médio observado no teste colorimétrico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

| Tratamento | K | T_D | Oxigênio | pH | Amônia |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| S _{1,5} | 0,653±0,01 ^a | 1,06±0,026 ^a | 0,898±0,085 ^a | 6,796±0,021 ^{ab} | 0,016 |
| S ₂₀ | 0,743±0,017 ^b | 0,932±0,022 ^b | 0,620±0,357 ^{ab} | 6,794±0,053 ^{ab} | 0,032 |
| S ₂₅ | 0,755±0,032 ^b | 0,918±0,034 ^b | 0,594±0,088 ^b | 6,774±0,167 ^{ab} | 0,032 |
| S ₃₀ | 0,777±0,030 ^b | 0,892±0,034 ^b | 0,618±0,071 ^b | 6,742±0,027 ^a | 0,030 |
| S ₃₅ | 0,744±0,040 ^b | 0,932±0,052 ^b | 0,460±0,069 ^b | 6,822±0,079 ^b | 0,034 |

36.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS (T) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp.

A temperatura apresentou um efeito mais acentuado sobre o crescimento de *Euplotes* sp. conforme pode ser observado na Figura 3 e nas Tabelas 4 e 5. Nos tratamentos com menores temperaturas (T_{17} e T_{20}), o crescimento foi bastante limitado, sendo que o tamanho da população em T_{17} se manteve constante após o quarto dia ($p < 0,05$). Para os demais tratamentos a variação diária do número de células foi mais acentuada (Figura 4; Tabelas 5 e 6). Nos tratamentos T_{26} , T_{29} e T_{32} o crescimento populacional e a taxa de crescimento específico se mostraram superiores ($p < 0,05$) à dos demais tratamentos. O tempo de duplicação da população variou de $0,948 \pm 0,016$ (T_{29}) a $2,277 \pm 0,353$ dias (T_{17}) e também apresentou melhores resultados ($p < 0,05$) para T_{26} , T_{29} e T_{32} .

Nos tratamentos que apresentaram uma elevada taxa de crescimento da população (T_{26} , T_{29} e T_{32}) verificou-se também o declínio acentuado nos parâmetros de qualidade da água, principalmente em relação aos níveis de oxigênio e amônia total, Tabela 6. O oxigênio foi o único parâmetro de qualidade da água que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos no início do experimento, tabela 6. O pH inicial variou entre $7,90 \pm 0,14$ e $7,95 \pm 0,21$ e a amônia total inicial foi de $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para todos os tratamentos.

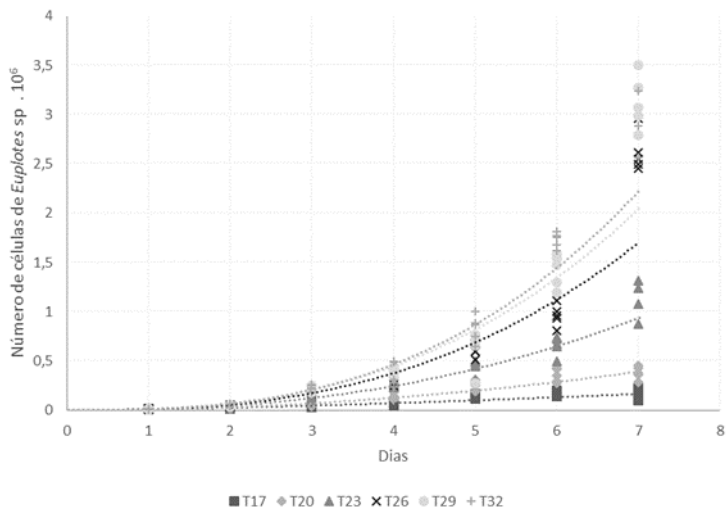
Tabela 5

Equações das curvas de regressão e coeficiente de correlação para o crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes temperaturas.

| Tratamento | Equação | R ² |
|------------|------------------------|----------------|
| T_{17} | $y = 9516,1x^{1,4685}$ | 0,874 |
| T_{20} | $y = 7698,7x^{2,0183}$ | 0,905 |
| T_{23} | $y = 9090,9x^{2,3818}$ | 0,959 |
| T_{26} | $y = 9105,7x^{2,6871}$ | 0,965 |
| T_{29} | $y = 10383x^{2,7138}$ | 0,960 |
| T_{32} | $y = 9730,1x^{2,7903}$ | 0,973 |

Figura 3 – A) Curva de crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes temperaturas. B) Variação da população final de *Euplotes* sp.

A)



B)

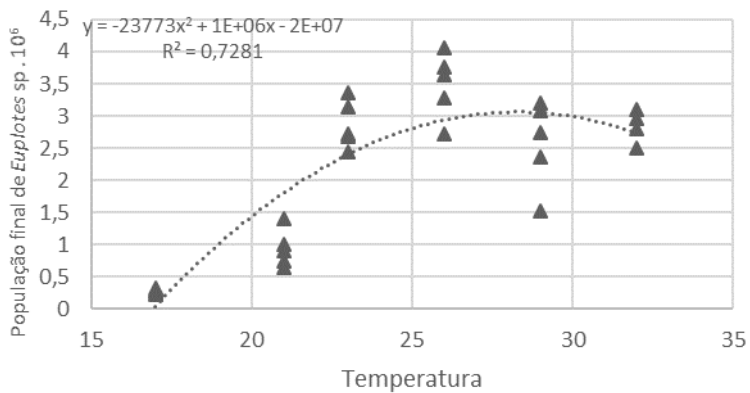


Tabela 6

Média (n=5) e desvio padrão da taxa de crescimento específico (K); tempo de duplicação da população (T_D), em dias; oxigênio; pH e amônia tóxica, para diferentes temperaturas. Os níveis de oxigênio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) estão representados para o primeiro (Inicial) e último dia (Final) do experimento. Os dados para pH e amônia tóxica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) representam os parâmetros observados no último dia de experimento. Dados para amônia tóxica representam o intervalo médio observado no teste colorimétrico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

| Tratamento | K | T_D | Oxigênio Inicial | Oxigênio Final | pH | Amônia |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|--------|
| T ₁₇ | 0,309±0,042 ^a | 2,277±0,353 ^a | 7,043±0,150 ^a | 4,702±0,389 ^a | 7,156±0,45 | 0,001 |
| T ₂₀ | 0,429±0,025 ^b | 1,619±0,100 ^b | 6,176±0,142 ^b | 2,974±0,271 ^b | 7,144±0,023 | 0,005 |
| T ₂₃ | 0,594±0,032 ^c | 1,169±0,064 ^c | 5,776±0,087 ^b | 0,898±0,068 ^c | 7,002±0,035 | 0,006 |
| T ₂₆ | 0,705±0,010 ^d | 0,983±0,014 ^d | 5,460±0,163 ^{bc} | 0,338±0,055 ^{cd} | 6,816±0,062 | 0,008 |
| T ₂₉ | 0,730±0,0123 ^d | 0,948±0,016 ^d | 5,153±0,300 ^{cd} | 0,194±0,077 ^{cd} | 6,912±0,468 | 0,018 |
| T ₃₂ | 0,704±0,037 ^d | 0,985±0,055 ^d | 4,823±0,213 ^d | 0,120±0,063 ^d | 6,976±0,025 | 0,052 |

36.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (TA) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes* sp.

O baixo nível ou a ausência de aeração demonstraram ser benéficos para o crescimento da população de *Euplotes* sp., conforme pode ser observado na Figura 4, Tabelas 7 e 8. Ao fim do experimento, a população de TA₀ e TA_{8.5} apresentaram maior crescimento populacional, melhores taxas de crescimento específico e tempo de duplicação da população, em relação aos demais tratamentos, alcançando valores máximos de 3,75 e 3,40 . 10⁶ células . L⁻¹, respectivamente, maiores valores observados dentro do período experimental.

No fim do período experimental foi possível observar o acentuado declínio do oxigênio (p<0,05), que atingiu níveis muito baixos, inferiores a 0,3 mg . L⁻¹, em TA₀ e TA_{8.5}, enquanto os tratamentos TA₂₀ e TA₁₀₀ apresentaram níveis de 2,346±0,54 e 4,614±0,58 mg . L⁻¹, respectivamente (Tabela 8). O pH final também diferiu significativamente (p<0,05) entre todos os tratamentos, Tabela 8. As médias de oxigênio, pH e amônia total não apresentaram diferença significativa (p>0,05) no início do experimento, variando entre 5,10±0,49 e 5,84±0,10 mg . L⁻¹; 7,96±0,05 e 8,05±0,03 e 0 mg . L⁻¹, respectivamente.

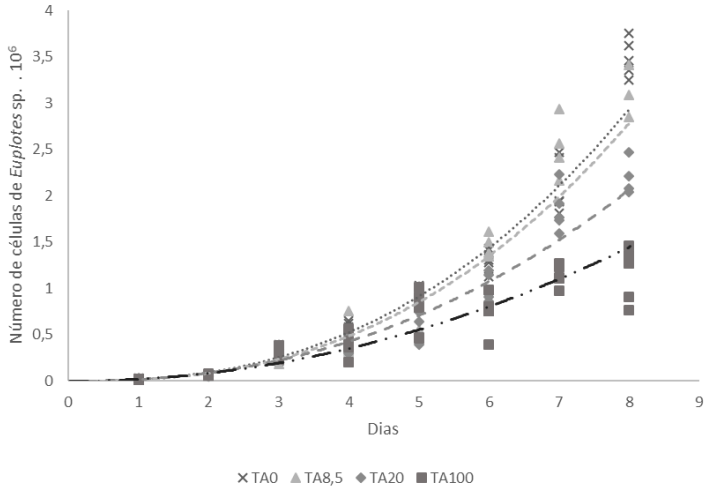
Tabela 7

Equações das curvas de regressão e coeficiente de correlação para o crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes taxas de aeração.

| Tratamento | Equação | R ² |
|-------------------|-----------------------|----------------|
| TA ₀ | $y = 20714x^{2,0417}$ | 0,949 |
| TA _{8.5} | $y = 18269x^{2,2734}$ | 0,966 |
| TA ₂₀ | $y = 14761x^{2,5201}$ | 0,965 |
| TA ₁₀₀ | $y = 16845x^{2,4817}$ | 0,979 |

Figura 4 – A: Curva de crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes taxas de aeração. B: Curva da população final de *Euplotes* sp. mantidos em diferentes taxas de aeração.

A)



B)

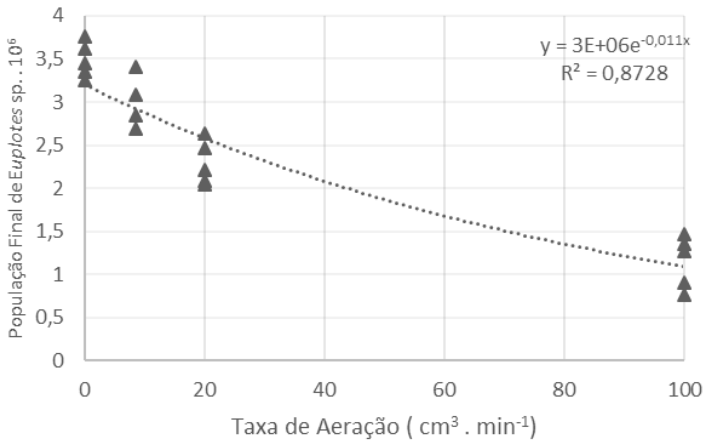


Tabela 8

Média (n=5) e desvio padrão da taxa de crescimento específico (K); tempo de duplicação da população (T_D), em dias; oxigênio; pH e amônia tóxica, para diferentes taxas de aeração. Os dados para oxigênio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), pH e amônia tóxica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) representam os parâmetros observados no último dia de experimento. Dados para amônia tóxica representam o intervalo médio observado no teste colorimétrico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

| Tratamento | K | T_D | Oxigênio | pH | Amônia |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|
| TA ₀ | 0,653±0,007 ^a | 1,061±0,011 ^a | 0,104±0,033 ^a | 6,858±0,017 ^a | 0,015 |
| TA _{8,5} | 0,6342±0,012 ^a | 1,093±0,021 ^a | 0,238±0,081 ^b | 6,974±0,008 ^b | 0,025 |
| TA ₂₀ | 0,599±0,013 ^b | 1,155±0,026 ^b | 2,346±0,545 ^c | 7,142±0,032 ^c | 0,015 |
| TA ₁₀₀ | 0,511±0,034 ^c | 1,361±0,095 ^c | 4,614±0,585 ^d | 7,512±0,092 ^d | 0,022 |

36.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FOTOPERÍODOS (F) NO CRESCIMENTO DE *Euplotes sp.*

O ciliado *Euplotes* apresentou um grande aumento populacional em todos os fotoperíodos analisados, Figura 5, Tabelas 9 e 10. A taxa de crescimento específico do tratamento F_{0:24} foi superior aos tratamentos F_{8:16} e F_{24:0} ($p < 0,05$), conforme pode ser verificado na Tabela 10, mas não se diferenciou ($p > 0,05$) de T_{16:8}. O tempo de duplicação da população também apresentou um melhor resultado para T_{0:24} ($p < 0,05$) em relação ao F_{8:16} e F_{24:0}. Porém a população final não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Os parâmetros de qualidade da água tiveram acentuada queda em todos os tratamentos, sendo observado níveis de oxigênio inferiores a 0,5 mg . L⁻¹ e os de amônia total superiores a 8 mg . L⁻¹, Tabela 10. No início do experimento não foram observada diferenças significativas ($p < 0,05$) para os níveis de oxigênio, pH, e amônia total, que variaram de $2,91 \pm 0,19$ a $3,04 \pm 0,12$ mg . L⁻¹; $7,70 \pm 0,02$ a $7,74 \pm 0,02$ e 0 mg . L⁻¹, respectivamente.

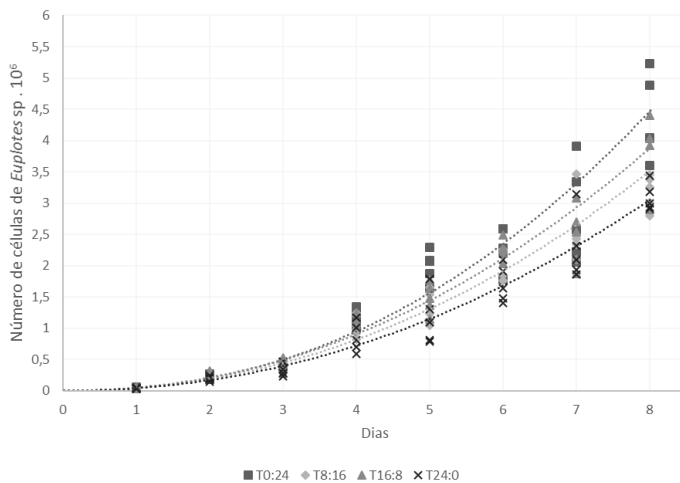
Tabela 9

Equações das curvas de regressão e coeficiente de correlação para o crescimento da população de *Euplotes sp.* em diferentes fotoperíodos.

| Tratamento | Equação | R ² |
|-------------------|-----------------------|----------------|
| F _{0:24} | $y = 42801x^{2,2356}$ | 0,978 |
| F _{8:16} | $y = 44119x^{2,105}$ | 0,982 |
| F _{16:8} | $y = 49119x^{2,1008}$ | 0,971 |
| F _{24:0} | $y = 40293x^{2,0811}$ | 0,973 |

Figura 5 – A) Curva de crescimento da população de *Euplotes* sp. em diferentes fotoperíodos. B) Variação da população final de *Euplotes* sp.

A)



B)

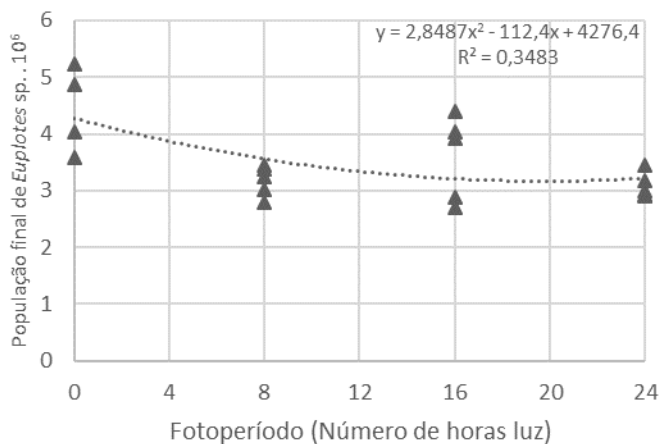


Tabela 10

Média (n=5) e desvio padrão da taxa de crescimento específico (K); tempo de duplicação da população (T_D), em dias; oxigênio; pH e amônia total, para diferentes fotoperíodos (F). Os dados para oxigênio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), pH e amônia tóxica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) representam os parâmetros observados no último dia de experimento. Dados para amônia tóxica representam o intervalo médio observado no teste colorimétrico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

| Tratamento | K | T_D | Oxigênio | pH | Amônia |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|--------|
| F _{0;24} | 0,673±0,026 ^a | 1,031±0,042 ^a | 0,28±0,101 | 7,175±0,03 ^a | 0,074 |
| F _{08;16} | 0,641±0,010 ^b | 1,081±0,018 ^b | 0,458±0,210 | 7,118±0,022 ^b | 0,059 |
| F _{16;08} | 0,654±0,027 ^{ab} | 1,060±0,044 ^{ab} | 0,282±0,149 | 7,052±0,042 ^c | 0,044 |
| F _{24;00} | 0,637±0,088 ^b | 1,086±0,008 ^b | 0,278±0,127 | 7,054±0,020 ^c | 0,044 |

37 DISCUSSÃO

No presente experimento observamos que a concentração de alimento e os fatores abióticos avaliados, salinidade; temperatura; aeração; fotoperíodo, afetaram o crescimento da população do ciliado *Euplotes* sp. Durante o período experimental foi possível verificar a rápida ascensão da população, chegando em alguns momentos a duplicar de tamanho diariamente. Junto com o rápido crescimento populacional também ocorreu a queda acentuada dos parâmetros de qualidade da água.

Em elevadas densidades de ciliados, acima de $3 \cdot 10^6$ células, foi possível observar que os níveis de amônia tóxica atingiram concentrações superiores a $0,070 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, valor considerado crítico para diversos organismos marinhos. Cortês et al. (2013) também observaram elevados níveis de amônia total, acima de $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ao alimentarem *Euplotes* sp. com fermento biológico por um período experimental de seis dias. Também foi possível observar no presente experimento que o ciliado *Euplotes* sp. é capaz de sobreviver em elevadas concentrações de amônia tóxica, acima de $0,272 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, porém estes elevados níveis podem ter tido um efeito negativo no crescimento populacional. Xu et al. (2004) consideraram o ciliado *Euplotes vanus* como extremamente tolerante a amônia, ao verificarem a sobrevivência de 45 % da população, após exposição a concentrações de amônia total de $8.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH, 8,2 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$), níveis considerados extremamente elevados para organismos aquáticos, por um período de 2 h. Porém, os autores observaram que ao manterem os ciliados em concentrações de amônia tóxica acima de $0,070 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ por um período prolongado, a taxa de crescimento da população foi afetada negativamente. No estudo de Yoo e Hur (2002), os autores observaram que o pH também pode influenciar no crescimento de *Euplotes* sp., sendo que, após o período de 7 dias, a população mantida em pH 7 se reduziu à metade ($1,2 \cdot 10^3 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$) quando comparada com aquela mantida em pH 8 ($2,6 \cdot 10^3 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$).

A concentração de alimento influenciou diretamente o crescimento da população de *Euplotes* sp., com o maior crescimento observado nas maiores concentrações, CA₂₅₀ e CA₅₀₀. Nas menores concentrações de alimento, CA₅₀ e CA₁₀₀, o crescimento foi muito limitado. Entre as hipóteses para explicar esse resultado podemos considerar a influência da concentração de alimento na taxa de ingestão e a disponibilidade de nutrientes fornecidos pela dieta, o que poderiam ter limitado o crescimento da população bacteriana. Wilks e Sleight (2008) ao alimentarem *Euplotes mutabilis* com diferentes concentrações de algas e

de microesferas plásticas, observaram que a concentração de alimento tem maior influência na taxa de ingestão do que o volume e o tamanho do alimento em si e que *E. muatbilis* não se alimenta em baixas concentrações. Lawrence e Snyder (1998) observaram que *Euplotes* sp possui uma elevada taxa de predação, sendo que a taxa individual média variou de 120 células . h⁻¹, para *Vibrio natrigens*, a 882 células . h⁻¹, para *Pseudomonas fluorescens*, e apesar da influência de diversos fatores na taxa de predação, a principal delas foi a densidade bacteriana. Outros autores (CORTÊS; TSUZUKI; MELO, 2013; YOO; HUR, 2002) avaliando o uso de dietas inertes na alimentação de *Euplotes* sp., como fermento biológico, também observaram elevadas taxas de crescimento para o ciliado. Yoo e Hur (2002) utilizando 1 g fermento . L⁻¹ na alimentação do ciliado e partindo da densidade inicial de estocagem de 100 ind. mL⁻¹, observaram a densidade máxima de 1,2 . 10³ células . mL⁻¹. Côrtes; Tsuzuki e Melo (2013) observaram a densidade máxima de 15,4 . 10³ células . mL⁻¹, ao utilizarem 0,5 g fermento . 10⁻⁶ células e densidade inicial de estocagem de 10 células . mL⁻¹.

Outro parâmetro que influenciou no crescimento de *Euplotes* sp. foi a temperatura. Nos tratamentos T₁₇ e T₂₀ o crescimento foi pequeno e a população se manteve constante após o quarto dia para o T₁₇, enquanto nos tratamentos com temperatura acima dos 23°C a velocidade de crescimento variou bastante. O aumento da temperatura proporcionou maior crescimento da população, mas também acelerou o declínio dos parâmetros de qualidade da água. Yoo e Hur (2002) ao avaliarem o crescimento de *Euplotes* sp. em diferentes temperaturas, no intervalo de 20 a 30 °C, verificaram que após o período experimental de 10 dias o maior crescimento ocorreu na temperatura de 22,5°C (2,4 . 10⁶ células . L⁻¹) e o pior resultado foi em 30°C (0,2 . 10⁶ células . L⁻¹). Como o período experimental do estudo de Yoo e Hur (2002) foi de 10 dias e os autores quantificaram a população de ciliados apenas ao final do experimento, pode ser possível que a curva de crescimento já estivesse na fase de declínio e que nas temperaturas mais elevadas esse processo possa ter sido acelerado, justificando o baixo desempenho das populações mantidas em temperaturas mais altas.

No experimento com diferentes taxas de aeração foi possível observar que o oxigênio chegou a níveis extremamente baixos (abaixo de 0,5 mg. L⁻¹) ao final do experimento, no TA₀ e TA_{8,5}. Apesar disso, nesses tratamentos, com pouca ou nenhuma aeração, houve um elevado crescimento da população dos ciliados durante o período experimental. Bernard e Fenchel (1996) observaram que duas espécies de *Euplotes* sp.

foram capazes de sobreviver e de se reproduzir em condições de anóxia, porém com menor crescimento, em comparação com a população mantida em um ambiente aeróbico. Além dos níveis de oxigênio dissolvido, outros fatores podem ter influenciado na taxa de crescimento dos ciliados, como por exemplo a turbulência da água, que também está relacionada com o nível de aeração dos tanques. Dolan et al. (2003) ao avaliarem quatro diferentes níveis de turbulência, verificaram um efeito negativo para o crescimento do ciliado *Strombidium sulcatum* e também para o crescimento da população bacteriana com o aumento da turbulência, que interferiu na ingestão do alimento e alterando a velocidade e o padrão de natação dos ciliados.

O crescimento de *Euplotes* sp não apresentou uma grande variação para o fotoperíodo e a salinidade, entre os tratamentos avaliados. No presente estudo o ciliado *Euplotes* sp. apresentou uma elevada taxa de crescimento tanto na ausência de luz ($T_{0:24}$) como na iluminação contínua ($T_{24:0}$). Foi possível verificar que mesmo o $F_{24:0}$ tendo apresentando um desempenho inferior ($p < 0,05$), quando comparado com o $F_{0:24}$, ainda foi possível observar uma elevada taxa de crescimento específico ($0,637 \pm 0,08$) e um pequeno período para duplicação da população ($1,086 \pm 0,008$ dias). O efeito do fotoperíodo no crescimento do ciliado marinho *Euplotes* sp. ainda não está bem elucidado, mas este parâmetro pode influenciar a fisiologia dos ciliados através do fototropismo (CADOTTE; JANTZ; MAI, 2007) e também pode exercer influência no crescimento e composição da comunidade bacteriana, o que pode afetar indiretamente a taxa de crescimento do ciliado (LEE et al., 2015). Alguns autores ainda verificaram que além do fotoperíodo, a intensidade luminosa também pode afetar o crescimento dos ciliados. Cheng e Chang (1999) observaram que a taxa de ingestão de células de microalgas pelo ciliado marinho *Lohmanniella* sp. foi inversamente proporcional ao aumento da intensidade luminosa e significativamente superior no escuro. No estudo de Yoo e Hur (2002) verificou-se que uma elevada intensidade luminosa, 3000 lux, também inibiu o crescimento da população de *Euplotes* sp.

Poucos estudos foram realizados para avaliar a influência da salinidade em ciliados marinhos. O presente experimento demonstrou que *Euplotes* sp. se adaptou bem dentro da faixa de salinidade avaliada, de 15 a 35 g . L⁻¹, que é normalmente utilizada na produção aquícola. Apesar de ter sido observado um crescimento inferior ($p < 0,05$) na salinidade de 15 g . L⁻¹, em comparação com as demais salinidades, o ciliado *Euplotes* sp. apresentou bons índices para a taxa de crescimento e tempo de duplicação

da população, em todos os tratamentos. Essa adaptação é uma característica desejável para espécies utilizadas como alimento vivo dentro da produção aquícola, em que larvas de diversas espécies de peixes podem ser produzidas em diferentes salinidades.

A determinação dos parâmetros adequados para a produção é um ponto chave pois nos permite ter maior controle populacional, garantindo a maior previsibilidade e escalonamento da produção, evitando colapsos e mantendo a produção mais estável.

38 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados do presente estudo, podemos concluir que o ciliado *Euplotes* apresentou características favoráveis à produção massiva para aquicultura, como resistência às condições adversas, entre elas, elevadas concentrações de amônia e a baixos níveis de oxigênio; pode ser produzido em elevadas densidades de estocagem; apresentam elevada taxa de crescimento; aceita fontes de alimento inerte como dieta; e se adapta bem em diferentes condições de salinidade e temperatura. Podemos considerar a faixa adequada para a produção do ciliado *Euplotes* sp. para temperatura entre 26 e 32°C; salinidade entre 20 e 35 g . L⁻¹, concentração de alimento de 250 mg . 10⁶ células⁻¹; devem ser mantidos com baixos níveis ou ausência de aeração e com fotoperíodo entre 0L : 24E e 16L : 8E.

39 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a toda a equipe da University of Florida, Aquaculture facility - Indian River Research and Education Center.

40 REFERÊNCIAS

- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estevez, A., Shields, R. J., Sargent, J. R., 2003. Optimizing lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211–220`.
- Cadotte, M. W., Jantz, S., Mai, D. V., 2007. Photo-dependent population dynamics of *Stentor coeruleus* and its consumption of *Colpidium striatum*. *Canadian journal of zoology* 85(5), 674-677.

- Chen, K. M., Chang, J., 1999. Influence of light intensity on the ingestion rate of a marine ciliate, *Lohmanniella* sp. J Plankton Res 21, 1791-1798.
- Côrtes, G. F., Tsuzuki, M. Y., Melo, E. M. C., 2012. Monoculture of the ciliate protozoan *Euplotes* sp. (Ciliophora; Hypotrichia) fed with different diets. Acta Scientiarum Biol Sci 35(1), 15-19.
- Dolan, J. R., Sall, N., Metcalfe, A., Gasser, B., 2003. Effects of turbulence on the feeding and growth of a marine oligotrich ciliate. Aqua Microbial Ecol 31(2), 183-192.
- Bernard, C., Fenchel, T., 1996. Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes. European J Protistology 32(3), 293-297.
- Figueiredo, G. M., Nash, R. D., Montagnes, D. J., 2007. Do protozoa contribute significantly to the diet of larval fish in the Irish Sea? J Mar Biol Assoc United Kingdom 87(04), 843-850.
- Fukami, K., Watanabe, A., Fujita, S., Yamaoka, K., Nishijima, K., Nishijima, T., 1999. Predation on naked protozoan microzooplankton by fish larvae. Marine Ecol Progr Ser 185, 285-291
- Hill, B. F., Small, E. B., Iliffe, T. M., 1986. *Euplotes iliffei* n. sp.: a new species of Euplotes (Ciliophora, Hypotrichida) from the marine caves of Bermuda. J Wash Acad Sci 76(4), 244-249.
- Holt, G. J. 2003. Research in culturing the early life stages of marine ornamental fish. In: Marine Ornamental Species Collection, Culture and Conservation (eds J. C. Cato and C. I. Brown), Iowa State Press. p. 252-254.
- Holt, G. J., Holt, S. A., 2000. Vertical distribution and the role of physical processes in the feeding dynamics of two larval sciaenids *Sciaenops ocellatus* and *Cynoscion nebulosis*. Mar Ecol Prog Ser193, 181-190.
- Hunt von Herbing, I., Gallagher, S.M., 2000. Foraging behaviour in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). Mar Biol 136, 591-602.
- Kamiyama, T., 1994. The impact of grazing by microzooplankton in northern Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea, Japan Mar Biol 119, 77-88.
- James, C.M. and Al-Khars, A.M., 1986. Studies on the production of planktonic copepods for aquaculture. Syllogus 58, 333-340.

- Lawrence, J. R., Snyder, R. A., 1998. Feeding behaviour and grazing impacts of a *Euplotes* sp. on attached bacteria. *Canad J Microbiol* 44(7), 623-629.
- Madhu, K., Madhu, R., 2014. Captive spawning and embryonic development of marine ornamental purple firefish *Nemateleotris decora* (Randall & Allen, 1973). *Aquaculture* 424, 1-9.
- Moorhead, J. A., Zeng, C., 2010. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. *Rev Fish Biol Fisher* 18(4), 315-343.
- Nagano, N., Iwatsuki, Y., Kamiyama, T., Shimizu, H., Nakata, H. (2000). Ciliated protozoans as food for first-feeding larval grouper, *Epinephelus septemfasciatus*: laboratory experiment. *Plankton Biol. Ecol*, 47(2), 93-99.
- Nagano, N., Iwatsuki, Y., Kamiyama, T., Nakata, H., 2000. Effects of marine ciliates on survivability of the first-feeding larval surgeonfish, *Paracanthurus hepatus*: laboratory rearing experiments. *Hydrobiologia* 432, 149-157.
- Ohman, M. D., Snyder, R. A., 1991. Growth kinetics of the omnivorous oligotrich ciliate *Strombidium* sp. *Limnology and Oceanography* 36(5), 922-935.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M. and Carnevali, O., 2005. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture* 250(1), 175-182.
- Pandey, B. D., Yeragi, S. G., 2004. Preliminary and mass culture experiments on a heterotrichous ciliate, *Fabrea salina*. *Aquaculture* 232(1), 241-254.
- Rhodes, M. A., Phelps, R. P., 2008. Evaluation of the ciliated protozoa, *Fabrea salina* as a first food for larval red snapper, *Lutjanus campechanus* in a large scale rearing experiment. *J Appl Aquacult* 20(2), 120-133.
- Riley, C.M., G., J. H., 1993. Gut contents of larval fishes from light trap and plankton net collections at Enmedio Reef near Veracruz, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 41(1), 53-57.
- Rossi, S., Sabatés, A., Latasa, M., Reyes, E., 2006. Lipid biomarkers and trophic linkages between phytoplankton, zooplankton and anchovy

(*Engraulis encrasicolus*) larvae in the NW Mediterranean. J Plankton Res 28(6), 551-562.

Schipp, G. R., Bosmans, J. M., Marshall, A. J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174(1), 81-88.

Schipp, G., 2006. The use of Calanoid copepods in semiintensive, tropical marine fish larviculture. En: Editores: Cruz Suárez LE, Marie DR, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Ortega AG. Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15–17 November. Universidad Autónoma de Nuevo León, México, p. 84–94.

Støttrup, J. G., 2003. Production and nutritional value of copepods. In: Støttrup JG, McEvoy LA (eds) Live feeds in marine aquaculture. Blackwell, Oxford, p. 318.

Taniguchi, A., 1977. Biomass and size composition of copepod nauplii and tintinnids in the Philippine Sea and the Celebes Sea, summer 1972. Bull Plankton Soc Jpn 24, 1-10.

Uye, S. I., Nagano, N., Tamaki, H., 1996. Geographical and seasonal variations in abundance, biomass and estimated production rates of microzooplankton in the Inland Sea of Japan. J Ocean 52(6), 689-703.

Xu, H., Song, W., Warren, A., 2004. An investigation of the tolerance to ammonia of the marine ciliate *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). Hydrobiologia, 519(1-3), 189-195.

Yoo, J. H., & Hur, S. B. (2002). Evaluation of Six Species Ciliates as a Live Food and Culture Environment for *Euplotes* sp. Korean J Fish Aquat Sci 35(4), 342-347.

41 CONCLUSÕES GERAIS

- a) O copépode *B. similis* é uma espécie resistente às variações abruptas da temperatura, quando expostos a um aumento de até 4°C ou a diminuição de até 8°C. Os animais adultos apresentaram maior sensibilidade para temperaturas acima de 30°C, enquanto os náuplios são mais sensíveis para temperaturas acima de 32°C.
- b) A faixa entre 24 e 32 °C é adequada para produção da espécie, proporcionando elevada taxa de crescimento populacional, fecundidade, sobrevivência e acelerando o desenvolvimento do copépode.
- c) A temperatura de 22°C pode ser utilizada para aumentar a duração do estágio naupliar.
- d) A privação de luz provocou um efeito negativo sobre diversos parâmetros produtivos do copépode, incluindo parâmetros de crescimento, desenvolvimento e reprodução de *B. similis*. Porém o fotoperíodo 0L : 24E pode ser utilizado com o intuito de retardar o desenvolvimento naupliar.
- e) Ciclos luminosos superiores a 12 h são recomendados para suportar desenvolvimento adequado e para maximizar a produção de ovos de *B. similis*
- f) O copépode *B. similis* foi capaz de sobreviver em uma ampla faixa de salinidade, variando de 5 a 50 g . L⁻¹. Os adultos apresentaram maior resistência quando expostos às salinidades extremas. Porém o copépode não foi capaz de sobreviver na água doce.
- g) Os copépodes mantidos no intervalo entre 25 e 35 g . L⁻¹ apresentaram maior produção de ovos por fêmea em comparação a aqueles mantidos na salinidade de 15 g . L⁻¹.
- h) A taxa de eclosão dos ovos e a sobrevivência dos animais não foi afetada pela salinidade dentro do intervalo avaliado de 15 a 35 g . L⁻¹.
- i) O ciliado *Euplotes* sp. apresentou resistência às condições adversas, entre elas, elevadas concentrações de amônia tóxica e a níveis de oxigênio abaixo de 1 mg . L⁻¹.
- j) O ciliado *Euplotes* sp. pode alcançar elevadas densidades, superando o valor de 5 . 10³ células . mL⁻¹., apresentam elevada

taxa de crescimento; podendo duplicar o tamanho da população diariamente.

- k) A maximização do crescimento de *Euplotes* sp. foi observada no intervalo de temperatura de 26 a 32 °C; na salinidade entre 20 e 35 g . L⁻¹; na concentração de alimento de 250 mg . 10⁶ células⁻¹, no fotoperíodo entre 0L : 24E e 16L : 8E e com baixo nível ou ausência de aeração.

42 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F., Adams, T. E., Olaji, E. D., Nwogu, N. A. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. **Rev Fish Biol Fisher** 21, 225- 246, 2011.
- Alajmi, F., Zeng, C., Jerry, D. R. Improvement in the reproductive productivity of the tropical calanoid copepod *Parvocalanus crassirostris* through selective breeding. **Aquaculture** 420, 18-23, 2014.
- Andronov, V. N. Veslonogie rachki Bestiola gen. n. (Copepoda, Paracalanidae).[Bestiola gen. n.(Copepoda, Paracalanidae). **Zoologicheskii Zhurnal** 51, 290-292, 1972.
- Andronov, V. N. Ob izmenenii nazvanii nekotorykh taksonov Calanoida (Crustacea) - **Zoologicheskii Zhurnal** 70, 133–134, 1991.
- Barroso, M.V., C.V.A. de Carvalho, R. Antoniassi, V.R. Cerqueira. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. **Aquaculture** 388-391, 153- 158, 2013.
- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estevez, A., Shields, R. J., Sargent, J. R. Optimizing lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. **Aquaculture** 227, 211–220, 2003.
- Bengtson, D.A. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. In: **Live Feeds in Marine Aquaculture** (J.G. Strottrup e L.A. McEvoy ed.). Blackwell publishing, Oxford, p. 1-16, 2003.
- Bergreen, U., Hansen, B., Kiorboe, T. Food-size spectra ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa*: implications for the determination of copepod production. **Mar Biol** 99, 341-352, 1988.
- Bi, H. S., Peterson, W. T., Lamb, J., Casillas, E. Copepods and salmon: Characterizing the spatial distribution of juvenile salmon along the Washington and Oregon coast, USA, Fish. **Oceanogr**, 20(2), 125–138, 2011.
- Bogolino, A., Darias, M. J., Estevez, A., Andree, K. B., Gisbert, E. The effect of dietary arachidonic acid during the *Artemia* feeding period on larval growth and skeletogenesis in Senegalese sole, *Solea senegalensis*. **J. Appl. Ichthyol** 28, 411-418, 2012.
- Bonnet, D., Harris, R., Lopez-Urrutia, A., Halsband-Lenk, C., Greve, W., Valdes, L., Wiltshire, K. Comparative seasonal dynamics of

Centropages typicus at seven coastal monitoring stations in the North Sea, English Channel and Bay of Biscay. **Prog oceano**, 72(2), 233-248, 2007.

Buskey, E. J., Coulter, C., Strom, S. Locomotory patterns of microzooplankton: potential effects on food selectivity of larval fish. **Bull Mar Sci** 53(1), 29-43, 1993.

Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comp Biochem Physiol** 130, 477-487, 2001.

Camus, T., Zeng, C. The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture** 287, 145–151, 2008.

Camus, T., Zeng, C., McKinnon, A. D. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. **Aquaculture** 297, 169–175, 2009.

Chesney, E. J. Copepods as live prey: a review of factors that influence the feeding success of marine fish larvae. In: **Copepods in Aquaculture** (Lee C.S., O'Bryen P.J., Marcus N.H. ed.). Blackwell Publishing, Oxford, UK. p. 133-150, 2005.

Chinnery, F. E., Williams, J. A. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. **Marine Biology** 145, 733-738, 2004.

Conceicao, L. E., Yufera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M. T. Live feeds for early stages of fish rearing. **Aquac Res** 41, 613–640, 2010.

Côrtes, G. F., Tsuzuki, M. Y., Melo, E. M. C. Monoculture of the ciliate protozoan *Euplotes* sp. (Ciliophora; Hypotrichia) fed with different diets. **Acta Scientiarum Biol Sci** 35(1), 15-19, 2012.

Drillet, G., Jørgensen, N. O., Sørensen, T. F., Ramløv, H., Hansen, B.W. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. **Aquac Res** 37(8),756-772, 2006.

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A.K., Hansen, BW. Status and recommendations on marine

- copepod cultivation for use as live feed. **Aquaculture** 315, 155–166, 2011.
- Dussart, B. H. and Defaye, D. Introduction to the Copepoda. In: **Guides to the Identification of the Macroinvertebrates of the Continental Waters of the World** (Dumont, H. J. ed.). Backhuys, Leiden, p. 344, 2001.
- Dutz, J., Peters, J. Importance and nutritional value of large ciliates for the reproduction of *Acartia clausi* during the post spring-bloom period in the North Sea. **Aqua Microb Ecol** 50(3), 261-277, 2008.
- Engell-Sørensen, K., Støttrup, J. G., Holmstrup, M. Rearing of flounder (*Platichthys flesus*) juveniles in semiextensive systems. **Aquaculture** 230(1), 475-491, 2004.
- Evjemo, J. O., Reitan, K. I., Olsen, Y. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. **Aquaculture** 227(1), 191-210, 2003.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2010.
- Fereidouni, A. E., Meskar, S., Asil, S. M. Effects of photoperiod on offspring production, development and generation time, survival, adult sex ratio and total life span of freshwater cyclopoid copepod, *Mesocyclops* sp.: comments on individual variations. **Aquac Res** 46, 163-172, 2015.
- Figueiredo, G. M., Nash, R. D., Montagnes, D. J. Do protozoa contribute significantly to the diet of larval fish in the Irish Sea? **J Mar Biol Assoc United Kingdom** 87(04), 843-850, 2007.
- Fukami, K., Watanabe, A., Fujita, S., Yamaoka, K., Nishijima, K., Nishijima, T. Predation on naked protozoan microzooplankton by fish larvae. **Marine Ecol Progr Ser** 185, 285–291, 1999.
- Giesbrecht, W. Elenco dei copepodi pelagici raccolti dal tenente di vascello Gaetano Chierchia durante il viaggio della R. Corvetta “Vettor Pisani” negli anni 1882–1885, e dal tenente di vascello Francesco Orsini nel Mar Rosso, nel 1884.—**Atti dell’Accademia nazionale dei Lincei, Rendiconti** 4(284–287), 330–338, 1888.

Hill, B.F., Small, E.B., Iliffe, T.M. *Euplotes iliffei* n. sp.: a new species of *Euplotes* (Ciliophora, Hypotrichida) from the marine caves of Bermuda. **J Wash Acad Sci** 76(4), 244-249, 1986.

Holste, L., Peck, M. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. **Mar Biol**, 148, 1061–1070, 2006.

Holt, G. J., Holt, S. A. Vertical distribution and the role of physical processes in the feeding dynamics of two larval sciaenids *Sciaenops ocellatus* and *Cynoscion nebulosus*. **Mar Ecol Prog Ser** 193, 181-190, 2000.

Holt, G. J. Research in culturing the early life stages of marine ornamental fish. In: **Marine Ornamental Species Collection, Culture and Conservation** (J. C. Cato and C. I. Brown ed.), Iowa State Press. p. 252-254, 2003.

Hunt von Herbing, I., Gallager, S.M. Foraging behaviour in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). **Mar Biol** 136, 591-602, 2000.

Huntley, M. E. Chemically-mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. **Mar Ecol Prog Ser** 28, 105-120, 1986.

Ikewaki, Y., Tanaka, M. Feeding habits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae in the western part of Wakasa Bay, the Japan Sea. **Nippon Suisan Gakkaishi** 59(6), 951-956, 1993.

Izquierdo, M. S., Tandler, A., Salhi, M., Kolkovski, S. Influence of dietary polar lipids' quantity and quality of ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead seabream. **Aquaculture Nutr** 7(3), 153-160, 2001.

Jepsen, P. M. **Copepods as live feed - optimisation and use in aquaculture**. 194 p. Tese de doutorado. Department of Environmental, Social and Spatial Changes, Roskilde University, Denmark Januar, 2014.

Kamiyama, T. The impact of grazing by microzooplankton in northern Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea, Japan **Mar Biol** 119, 77-88, 1994.

Kleppel, G. S., Hazzard, S. E., 2002. The significance of zooplankton nutrition in the aquatic sciences. Outcomes of an international workshop on zooplankton nutrition. University of South Carolina, Columbia

- Kline, M. D., Laidley, C. W. Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: Optimizing adult density. **Aquaculture** 435, 128-136, 2015
- Knuckey, R. M., Semmens, G. L., Mayer, R. J., Rimmer, M. A. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. **Aquaculture** 249(1), 339-351, 2005.
- Kolkovski, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles: implications and applications to formulated diets. **Aquaculture** 200(1), 81-201, 2001.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel M., Behrens, P., Tandler, A. The effect of dietary arachidonic acid (20: 4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture** 193, 107-122, 2001.
- Kraul, S. Live food for marine fish larvae. En Editores: Cruz Suárez LE, Marie DR, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Puello Cruzy AC, García Ortega A. In: **Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre**. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, p. 55-61, 2006.
- Lair, N., Leveille, J.C., Reyes-Marchant, P., Taleb, H. The feeding of a larval fish, *Lebistes reticulatus*, on ciliates and rotifers. **Aqua Microb Ecol** 8, 337-346, 1994.
- Lavens P., Sorgeloos P. In: **Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Technical Papers 361**. FAO, Rome, Italy, p. 295, 1996.
- Lemus, J. T., Blaylock, R. B., Apeitos, A., Lotz, J. M. Short-term effect of first prey type and number on survival and growth of intensively cultured Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae), larvae. **J World Aquac Soc.** 41, 455-463, 2010.
- Lessard, E. J., Murrell, M. C. Distribution, abundance and size composition of heterotrophic dinoflagellates and ciliates in the Sargasso Sea near Bermuda. **Deep-Sea Res Pt I** (7), 1045-1065, 1996.
- Liao, I. C., Su, H. M., Chang, E. Y. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture** 200, 1-31, 2001.

- Lima, L. C. M., Navarro, D. M. A. F., Souza-Santos, L. P. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. **J Crustacean Biol** 33, 372-381, 2013.
- Lubzens, E., Minkoff, G., Barr, Y., Zmora, O. Mariculture in Israel – past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. **Hydrobiologia** 358, 13-20, 1997.
- Madhu, K., Madhu, R. Captive spawning and embryonic development of marine ornamental purple firefish *Nemateleotris decora* (Randall & Allen, 1973). **Aquaculture** 424, 1-9, 2014.
- Mauchline, J. Advances in marine biology—The biology of calanoid copepods. **Adv Mar Biol** 33, 710, 1998.
- McEvoy, L. A., Naess, T., Bell, J. G., Lie, Ø. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched Artemia: a comparison with fry fed wild copepods. **Aquaculture** 163(3), 237-250, 1998.
- McKinnon, A. D., Ayukai, T. Copepod egg production and food resources in Exmouth Gulf, Western Australia. **Mar Fresh Res** 47(4), 595-603, 1996.
- McKinnon, A. D., and D. W. Klumpp Mangrove zooplankton of north Queensland, Australia. **Hydrobiologia** 362(1-3), 145-160, 1998.
- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., Robino, B. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. **Aquaculture** 223, 89-106, 2003.
- Milione, N., Zeng, C. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture** 275, 116–123, 2008.
- Montagnes, D. J., Dower, J. F., Figueiredo, G. M. The Protozooplankton–Ichthyoplankton Trophic Link: An Overlooked Aspect of Aquatic Food Webs. **J Euk Microbiol** 57(3), 223-228, 2010.
- Moon, S. Y., Lee, W., Soh, H. Y. A new species of *Bestiolina* (Crustacea: Copepoda: Calanoida) from the Yellow Sea, with notes on the zoogeography of the genus. **Proc Biol Soc Wash** 123(1), 32-46, 2010.
- Moorhead, J. A., Zeng, C. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. **Rev Fish Biol Fisher** 18(4), 315-343, 2010.

- Nagano, N., Iwatsuki, Y., Kamiyama, T., Nakata, H. Effects of marine ciliates on survivability of the first-feeding larval surgeonfish, *Paracanthurus hepatus*: laboratory rearing experiments. **Hydrobiologia** 432, 149-157, 2000.
- Nagano, N., Iwatsuki, Y., Kamiyama, T., Shimizu, H., Nakata, H. Ciliated protozoans as food for first-feeding larval grouper, *Epinephelus septemfasciatus*: laboratory experiment. **Plankton Biol. Ecol**, 47(2), 93-99, 2000.
- Nakagawa, Y., Kurata, M., Sawada, Y., Sakamoto, W., Miyashita, S. Enhancement of survival rate of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) larvae by aeration control in rearing tank. **Aquatic Living Resources** 24(04), 403-410, 2011.
- Nanton, D. A., Castell, J. D. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as live food for marine fish larvae. **Aquaculture** 175, 167-18, 1999.
- Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy L. A., Bell, M. V., Amat, F. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. **Aquaculture** 174, 155-166, 1999.
- Nellen, W., Quantz, G., Witt, U., Kuhlmann, D., & Koske, P. H.. Marine fish rearing on the base of an artificial food chain. **Eur Maric Soc Spec Publ**, 6, 133-147, 1981.
- Nelson, Randy J., David L. In: **Photoperiodism: the biological calendar** (Denlinger, and David E. Somers, eds). Oxford University Press, 2009.
- Ogle, J. T., Lemus, J. T., Nicholson, L. C., Barnes, D. N., Lotz, J. M. Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of red snapper *Lutjanus campechanus*. In: **Copepods in aquaculture** (Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus N. H. ed.). Blackwell, Oxford, p. 225–244, 2005.
- Ohman, M. D., Snyder, R. A. Growth kinetics of the omnivorous oligotrich ciliate *Strombidium* sp. **Limnology and Oceanography** 36(5), 922-935, 1991.
- Ohs, C. L., A. L. Rhyne, S. W. Grabe, M. A. DiMaggio, and Stenn E. Effects of salinity on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. **Aquaculture** 307, 219-224, 2010.
- Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C. C., Malzone, M. G., Carnevali, O. The use of the Mediterranean calanoid copepod

Centropages typicus in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. **Aquaculture** 284(1), 211-216, 2008.

Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M. and Carnevali, O. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. **Aquaculture** 250(1), 175-182, 2005.

Olivotto, I., Tokle, N. E., Nozzi, V., Cossignani, L., Carnevali, O. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. **Aquaculture** 308(3), 124-131, 2010.

Pauly, D., Christensen, V. Primary production required to sustain global fisheries. **Nature** 374 (6519), 255-257, 1995.

Payne, M. F., Rippingale, R. J. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. **Aquaculture** 201, 329-342, 2001.

Pereira, Juliano Bicalho. **Composição, diversidade, distribuição temporal e espacial dos Copepoda relacionados à hidroquímica no estuário dos rios Piraquê-açú e Piraquê-mirim, Aracruz, Espírito Santo**. p. 36. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do espírito Santo, 2004.

Pereira, Juliano Bicalho **Composição, Distribuição, biomassa e produção secundária fazer zooplâncton do Sistema Estuarino de Santos, São Paulo, Brasil**. p. 303. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Qin J. G. In: **Larval Fish Aquaculture**. (J. G. Qin ed.) Nova Science Publishers, New York. p. 230, 2013.

Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Olsen, Y. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. **Aquaculture** 155,105-118, 1997.

Rajkumar, M., Vasagam, K. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. **Aquaculture** 261,649-658, 2006.

Rhyne, A. L., Ohs, C. L., Stenn, E. Effects of temperature on reproduction and survival of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. **Aquaculture** 292(1), 53-59, 2009.

- Riley, C.M., G., Holt, J. Gut contents of larval fishes from light trap and plankton net collections at Enmedio Reef near Veracruz, Mexico. **Revista de Biología Tropical** 41(1), 53-57, 1993.
- Rønnestad, I., Helland, S., Lie, Ø. Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. **Aquaculture** 165, 159-164, 1998.
- Rønnestad, I., Conceição, L. E. Aspects of protein and amino acids digestion and utilization by marine fish larvae. **Phys Ecol Adap Feed Vert**, 389-416, 2005.
- Sakakura, Y., Shiotani, S., Chuda, H., & Hagiwara, A. Improvement of the survival in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* larvae by optimizing aeration and water inlet in the mass-scale rearing tank. *Fisher Sci* 72(5), 939-947, 2006.
- Sampey, A., McKinnon, A. D., Meekan, M. G., McCormick, M. I. Glimpse into guts: overview of the feeding of larvae of tropical shorefishes. **Mar Ecol Prog Ser** 339, 243–257, 2007.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell, J. G. Requirements, presentation and sources of unsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture** 155, 117–127, 1997.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, 179(1), 217-229, 1999.
- Schipp, G. The use of Calanoid copepods in semiintensive, tropical marine fish larviculture. In: **Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15–17 November.** Universidad Autónoma de Nuevo León, México, p. 84–94, 2006.
- Sewell, R. B. S. Notes on the surface-living Copepoda of the Bay of Bengal I and II. **Records of the Indian Museum, Calcutta** 7:313–382, figs. 1–5, pls. 14–24. 1912.
- Sewell, R. B. S. Notes on the surface Copepoda of the Gulf of Mannar. **Spolia Zeylanica** 9, 191–262. 1914.
- Shen, C.-J., & F.-S. Lee. On the estuarine copepods of Chaikiang River, Kwangtung Province . **Acta Zootaxonomica Sinica** 3, 213–223, 1966.

Shields, R. J., Bell, J. G., Luizi, F. S., Gara, B., Bromage, N. R., Sargent, J. R. Natural copepods are superior to enriched *Artemia nauplii* as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. **J Nut** 129(6), 1186-1194, 1999.

Solgaard, G., Standal, I. B., Draget, K. I. Proteolytic activity and protease classes in the zooplankton species *Calanus finmarchicus*. **Comp Biochem Phys Part B: Biochem Mol Biol** 147(3), 475-481.

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

Souza-Santos, L. P., Pastor, J. M., Ferreira, N. G., Costa, W. M., Araújo-Castro, C., Santos, P. J. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. **Aquac Res** 37(15), 1516-1523, 2006.

Sterza, J. M., Fernandes, L. L. Zooplankton community of the Vitória Bay estuarine system (Southeastern Brazil): Characterization during a three-year study. **Brazilian J Oceanogr** 54(2-3), 95-105, 2006.

Sterza, J. M., Ovalle, A. R. C., Loureiro, L. F. Zooplankton distribution and abundance related to the hydrochemistry in a tropical bay (south-east Brazil). **Cahiers de biologie marine** 49(3), 229-245, 2008.

Støttrup, J. G. Production and nutritional value of copepods. In: **Live feeds in marine aquaculture** (Støttrup J. G., McEvoy L. A. ed.). Blackwell, Oxford, p. 318, 2003.

Su, H. M., Cheng, S. H., Chen, T. I., Su, M. S. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. In: **Copepods in aquaculture** (Lee C-S, O' Bryen P. J., Marcus N. H. ed.). Blackwell, Oxford, p. 11-24, 2005.

Toledo, J. D., Golez, M. S., Doi M., Ohno, A. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish Sci** 65, 390-397, 1999.

Toledo, J. D., Golez, M. S., Ohno, A. Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of grouper *Epinephelus Coioides*. In: **Copepods in aquaculture** (Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH ed.). Blackwell, Oxford, p. 11-24, 2005.

Treece, G. D., Davis, D. A. Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. **Southern Regional Aquaculture Center Publication 701**, 1-7, 2000.

Turingan, R. G., Beck, J. L., Krebs, J. M., Licamele, J. D. Development of feeding mechanics in marine fish larvae and the swimming behavior of zooplankton prey: implications for rearing marine fishes. In: **Copepods in aquaculture** (Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH ed.). Blackwell, Oxford. p. 119-132, 2005.

Uye, S. I., Nagano, N., Tamaki, H. Geographical and seasonal variations in abundance, biomass and estimated production rates of microzooplankton in the Inland Sea of Japan. **J Ocean** 52(6), 689-703, 1996.

Van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre K., Fyhn, H. J. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. **Aquaculture** 274, 375-397, 2008.

Van der Meeren, T. Selective feeding and prediction of food consumption in turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and natural zooplankton. **Aquaculture** 93, 35-55, 1991.

VanderLugt, K., Cooney, M.J., Lechner, A., Lenz, P.H. Cultivation of the paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Crustacea). **J World Aquaculture Soc** 40, 523-635, 2009.

Zhukova, N. V., Kharlamenko, V., I. Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. **Aquatic Microbial Ecology** 17(2), 153-157, 1999.

43 APÊNDICE

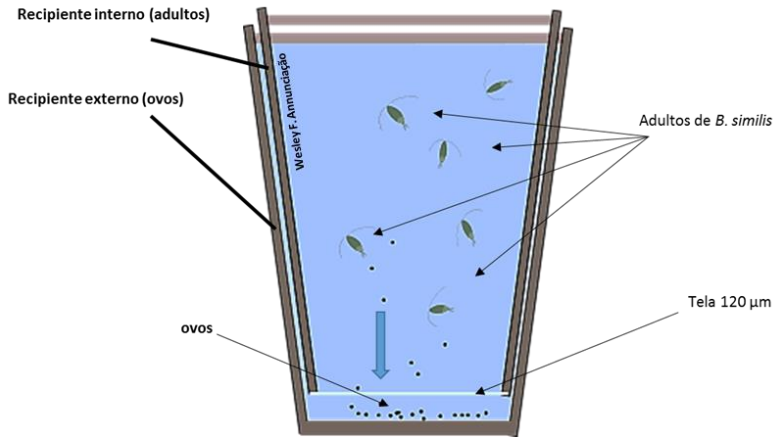


Figura 1: Ilustração da unidade experimental utilizada nos experimentos de produção de ovos de *B. similis*.



Figura 2: Unidades experimentais utilizadas no experimento de produção de ovos de *B. similis* em diferentes salinidades.



Figura 3: Detalhe de uma fêmea de *B. similis* durante a liberação dos ovos.

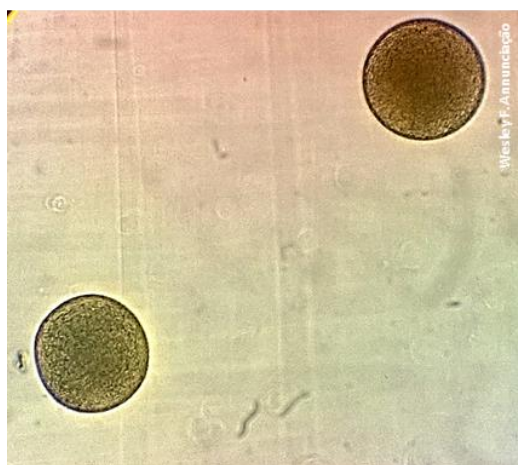


Figura 4: Detalhe dos ovos de *B. similis*.

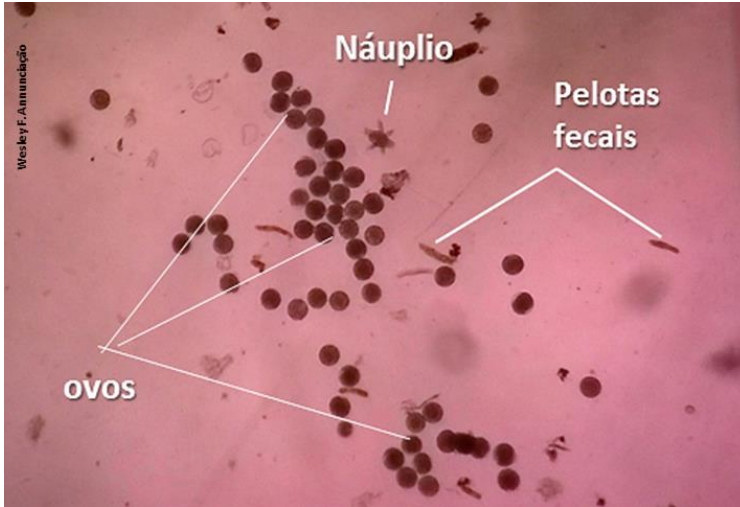


Figura 5: Detalhe dos ovos, náuplio recém eclodido e pelotas fecais de *B. similis*.



Figura 6: Tanques de produção de *B. similis*



Figura 7: Superior: Detalhe de uma das incubadoras utilizadas na realização do experimento para avaliação do efeito da temperatura no crescimento do ciliado *Euplotes* sp. Inferior: Detalhe do painel de controle da incubadora, com regulagem da temperatura, umidade e fotoperíodo.

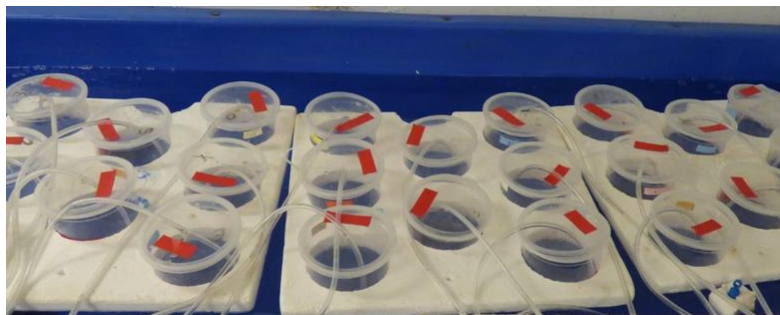


Figura 8: Unidades Experimentais utilizadas no experimento de salinidade com o ciliado *Euplotes* sp.