



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
LABORATÓRIO DE CULTIVO E ECOTOXICOLOGIA



Aurelyanna Christine Bezerra Ribeiro

Produção em massa e viabilidade do copépodo
Tisbe biminiensis (Harpacticoida) como alimento
para os estágios iniciais de pós-larvas (PL1 a PL10)
do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*
(Penaeidae)

Recife
2014

Aurelyanna Christine Bezerra Ribeiro

Produção em massa e viabilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* (Harpacticoida) como alimento para os estágios iniciais de pós-larvas (PL1 a PL10) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Oceanografia.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos

Recife
2014

Catálogo na fonte

Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

R484p Ribeiro, Aurelyanna Christine Bezerra.

Produção em massa e viabilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* (Harpacticoida) como alimento para os estágios iniciais de pós-larvas (PL1 a PL10) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) / Aurelyanna Christine Bezerra. - Recife: O Autor, 2014.

53 folhas, il., e tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2014.

Inclui Referências.

1. Oceanografia. 2. Produção de prole. 3. Utilização de ração.
4. Alimento vivo. 5. Larvicultura. 6. *Tisbe biminiensis*. 7. *Litopenaeus vannamei*.

I. Santos, Lília Pereira de Souza. (Orientadora). II. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.)

BCTG/2014-328

Cultivo em massa e viabilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* (Harpacticoida)
como alimento na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*
(Penaeidae)

Aurelyanna Christine Bezerra Ribeiro

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 22 de agosto de 2014

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos
(Orientadora e Presidente da Banca)

Profa. Dra. Sigrid Neumann-Leitão
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. Ronaldo Olivera Cavalli
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Prof. Dr. Mauro de Melo Júnior
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UAST)

Prof. Dr. Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Suplentes

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo castro
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Prof. Dr. Ralf Schwamborn
(Universidade Federal de Pernambuco)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Lília, não só a orientadora, mas a grande amiga. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Lília Pereira de Souza Santos, pela a orientação, pela amizade e pela motivação para que eu concluísse esse trabalho.

À Dra. Cristiane de Araújo Castro, pela valiosa amizade e por sua ajuda no decorrer destes anos de LACE;

À Adilma Cocentino, Thiago Reis, Daniele Viana, Arley Andrade e Lilian Cristine pela amizade e companheirismo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do primeiro capítulo deste trabalho como parte do projeto “Desenvolvimento do cultivo de beijupirá (*Rachycentron canadum*) no Nordeste do Brasil” nº. 485238/2007-1, sob a coordenação do Prof. Dr. Ronaldo Oliveira Cavalli.

À empresa Aqualider, em nome do diretor Manuel Tavares, e todos seus funcionários, pelo apoio na realização do experimento que compõe o Capítulo I deste trabalho;

À empresa Potiporã, sobretudo aos engenheiros de pesca André Jensen e Arthur Carneiro Leão, e a todos os funcionários envolvidos na execução do experimento que compõe o Capítulo III deste trabalho;

Aos professores da banca examinadora, pelas sugestões para o aprimoramento desta tese;

Aos professores, pesquisadores, funcionários e alunos do PPGO, pelos bons momentos compartilhados;

A todos que fizeram e fazem parte da equipe do Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia da UFPE: Cristiane Castro, Lilian Cristine, Deloar, Gaby, Rodolfo, Bia, Roberta, Cris Pequena, Cintia, Bruno, Rafaela, Ramon, Petrus, Arivânia, Nancilda e Yanna por todos os momentos que vivemos juntos, compartilhando as alegrias e os ensinamentos;

À minha família: Poly, Márcia, Naoto, Fred, Rô e todos (a família é grande) que me deram força pra concluir esse trabalho;

A Deus que está sempre presente em todos os momentos da minha vida.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta.”

Francisco Xavier

“Entende-se como FÉ a confiança que se tem na realização de uma coisa, a certeza de atingir determinado fim. Ela dá uma espécie de lucidez que permite que se veja, em pensamento, a meta que se quer alcançar e os meios de chegar lá, de sorte que aquele que a possui caminha por assim dizer, com absoluta segurança.”

Allan Kardec

RESUMO

O alimento vivo é um fator fundamental para o desenvolvimento larval de crustáceos decápodes. Copépodos se destacam como alimento vivo para larvas carnívoras devido ao seu excelente valor nutricional, alta digestibilidade e tamanho adequado. Porém, o uso destes organismos em larviculturas ainda depende do aprimoramento das técnicas de cultivo. O presente trabalho foi dividido em três capítulos. O objetivo dos capítulos 1 e 2 foi aprimorar a técnica de cultivo do copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* e testar novas dietas. O cultivo dos copépodos foi realizado em volume de 15L em bandejas plásticas de 0,37m² adaptadas com drenos para facilitar a troca de água e coleta da prole. No Capítulo 1 foram testadas as rações Alcon Basic[®] Dieta Controle (RC), ração experimental para peixes Op0 (RE), ração comercial para peixes Nutripeixe AL55[®] (RP) e ração comercial para camarão marinho Camaronina CR1[®] (RCM). Apesar da boa aceitabilidade de todas as rações, diferiram de RC a ração RE, apresentando valores inferiores de produção de prole do início dos experimentos até o primeiro pico de produção e a ração RCM, que apresentou resultados inferiores na fase de estabilização da população total e no pico de produção de prole. A produção diária por caixa de cultivo foi de 9.000 ind. L⁻¹ ou 364.864 ind m². No Capítulo 2 a dieta controle (RC) foi comparada a dieta teste (RT) ração comercial para peixes marinhos, NRD 5/8, INVE. Durante o período experimental, a produção de prole obtida com a RT não diferiu da produção obtida com a RC, sendo em média 7.400 ind. L⁻¹. dia⁻¹ ou 300.000 ind. m². No Capítulo 3 foi avaliado o desempenho da prole de *T. biminiensis* como substituta dos náuplios recém-nascidos de *Artemia*, na alimentação das pós-larvas (PL1 a PL10) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Três tratamentos foram testados: T1 – Controle *Artemia*, T2 – Mix: *Artemia* + *T. biminiensis* e T3 – *T. biminiensis*. A sobrevivência no T1 foi significativamente maior em comparação com as demais (T1 100% > T2 52% = T3 51%). O comprimento larval foi significativamente maior no tratamento T2 (T2 7.9 mm > T1 7.1 mm = T3 6.8 mm) e não houve diferenças no peso seco. As adaptações realizadas nos sistemas de cultivo reduziram o esforço de coleta e a boa aceitação de *T. biminiensis* aos diversos tipos de ração reduziram os custos de produção. A quantidade produzida ainda é baixa, mas pode satisfazer a necessidade de setores como a aquicultura ornamental. Os bons resultados alcançados em termos de crescimento e peso no T2 indicam que a combinação de alimentos melhora a qualidade das pós-larvas. A menor sobrevivência das pós-larvas de *L. vannamei* nos tratamentos T2 e T3 podem estar relacionada a predação, pelos copépodos, de pós-larvas debilitadas. A presença de bactérias patogênicas provindas dos cultivos de copépodos deve ser investigada no futuro. Os resultados indicam que na ausência ou restrição de cistos de *Artemia* no mercado o cultivo de copépodos poderia vir a representar uma alternativa para as larviculturas desta espécie.

Palavras-chave: produção de prole, utilização de ração, alimento vivo, larvicultura, *Tisbe biminiensis*, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The live food is essential for optimal larval development of decapod crustaceans. Copepods offer excellent nutritional quality, a high degree of digestibility and an adequately small size. However, the use of these organisms in hatcheries still depends on the improvement of farming techniques. This work was divided into three chapters. The aim of Chapters 1 and 2 was to improve the technique of cultivation of harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* and test new diets. The cultures were performed in plastic trays (0.37 m²) in volumes of 15 L with drains to facilitate the water exchange and collection of the offspring. In chapter 1, were tested control diet Alcon Basic® (CD) an experimental diet (ED) for *Rachycentron canadum* juveniles Op0; a commercial diet Nutripeixe AL55® (FD) and a commercial diet for marine shrimp Camaronina CR1® (MSD). In comparison to the CD treatment, the ED led to significantly lower offspring production from the beginning of the experiment through to peak production and the MSD achieved significantly poorer results regarding the stabilization phase of the overall population and peak offspring production. The results of the daily production per cultivation unit was 9000 ind. L⁻¹ or 364,864 ind m². In Chapter 2 the control diet (CD) was compared to test diet (TD) commercial feed for marine fish, NRD 5/8, INVE. During the experimental period, the production of offspring obtained with TD did not differ in yield with the RC, averaging 7,400 ind. L⁻¹. ind day⁻¹ or 300,000. m². In Chapter 3 was evaluated the performance of offspring of the *T. biminiensis* like substitute of nauplii of *Artemia* in feeding post-larvae (PL1 to PL10) of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. Three treatments were tested: T1 - *Artemia* Control, T2 - Mix: *T. biminiensis* + *Artemia* and T3 - *T. biminiensis*. The Survival in T1 was significantly higher compared with the other treatments (T1 100% > T2 52% = T3 51%). Larval length was significantly higher in T2 (T2 7.9 mm > T1 7.1 mm = T3 6.8 mm) and no differences in dry weight. The adaptations carried in plastic trays reduced the harvest effort and the. The good acceptance of *T. biminiensis* the different types of diet reduce production costs. The number of offspring produced is still low, but it can satisfy the sectors such as ornamental aquaculture. The good results achieved in T2 (growth and weight) indicate that the combination of foods improves the quality of post-larvae. The lower survival of post-larvae in treatments T2 and T3 may be related to predation of the weakened post-larvae by copepods. The presence of pathogenic bacteria in cultures of copepods should be investigated in the future. The results indicate that in the absence or restriction of *Artemia* cysts, the copepods cultures may represent an alternative to the hatcheries.

Keywords: production of offspring, use of feed, live feed, hatchery *Tisbe biminiensis*, *Litopenaeus vannamei*

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.1 Means and standard deviation ($\pm$ SD) of the total number and offspring of the *Tisbe biminiensis* harvest in 15 L cultures throughout the 30 days with the three diets (CD – Control Diet; ED – Experimental Diet and FD – Fish Diet). 22
- Fig. 1.2 Means and standard deviation ($\pm$ SD) of the total number and offspring of the *Tisbe biminiensis* harvest in 15 L cultures throughout the 30 days with the two diets (DC – Control Diet and MSD – Marine Shrimp Diet). 23
- Fig. 2.1 Médias ($\pm$ DP) da quantidade de prole de *Tisbe biminiensis* produzida em cultivos 15 L durante 30 dias utilizando duas dietas (DC – Dieta Controle e DT – Dieta Teste). 35

LISTA DE TABELAS

Table 1.1	Parameters of regression analysis ($Y = a + bX$) between log time (X) and total number of <i>Tisbe biminiensis</i> (Y) during the population growth phase in both experiments.	21
Table 1.2	Proposed protocol for mass culture and offspring collection of the harpacticoid copepod <i>Tisbe biminiensis</i> .	25
Tabela 3.1	Concentração (ind. mL ⁻¹ dia ⁻¹) de náuplios recém-eclodidos de <i>Artemia</i> (Art) e prole de copépodo <i>Tisbe biminiensis</i> (Cops) ofertado às pós-larvas (PL) do Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> de diferentes idades.	42
Tabela 3.2	Média ($\pm$ desvio padrão) do peso seco, comprimento total e porcentagem de sobrevivência de pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> nos tratamentos Controle, Mix e Copépodo.	43
Tabela 3.3	Mortalidade acumulada das pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> após serem subitamente transferidas da água do mar para água doce.	44

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	12
2. Hipóteses	14
3. Objetivos	14
3.1 Objetivos gerais.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. Capítulo I	16
4.1 Abstract	16
4.2 Introduction	17
4.3 Materials and Methods	18
4.4 Results	20
4.5 Discussion	25
4.6 Conclusion.....	27
4.7 Acknowledgments.....	27
4.8 References.....	28
5. Capítulo II	31
5.1 Resumo.....	32
5.2 Introdução	32
5.3 Material e Métodos	33
5.4 Resultados e Discussão.....	34
6. Capítulo III	37
6.1 Resumo.....	38
6.1 Introdução	38
6.2 Material e Métodos	40
6.2.1 Cultivo de microalgas.....	40
6.2.2 Cultivo e coleta de copépodos.....	40
6.2.3 Avaliação do <i>Tisbe biminiensis</i> como alimento para pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
6.2.4 Teste de estresse	42
6.2.5 Análise estatística	43
6.3 Resultados	43
6.4 Discussão	44
6.5 Conclusão	47
7. Conclusões.....	48
8. Considerações Finais.....	49
9. Referências.....	50

1. Introdução Geral

De acordo com a FAO (2014), a produção oriunda da aquicultura em 2012 forneceu quase a metade do total de pescado consumido no mundo. No Brasil, o principal setor da aquicultura marinha é a carcinicultura, sendo responsável por cerca de 80% do total produzido entre 2008 e 2010 (MPA, 2012). O camarão marinho mais cultivado no Brasil é da espécie *Litopenaeus vannamei* Boone (1931), pertencente à ordem Decapoda e à família Penaeidae, em 2011 a sua produção no Brasil foi de 69.571 toneladas (ABCC/MPA, 2013).

A larvicultura é uma fase do cultivo de camarões onde as larvas e pós-larvas utilizadas para abastecer as fazendas de engorda são produzidas em grande escala. De acordo com ABCC/MPA (2013), a capacidade total de fornecimento dos laboratórios de produção de pós-larvas no Brasil é de 1,96 bilhão pós-larvas/mês, volume que atende a demanda nacional desse insumo.

O bom desempenho da carcinicultura está diretamente ligado ao fornecimento, por parte dos laboratórios de produção, de larvas e pós-larvas de boa qualidade para as fazendas de engorda, um dos fatores fundamentais para bom desenvolvimento desta fase é a alimentação, onde a qualidade, o tamanho e a quantidade de alimento oferecida às larvas e pós-larvas são aspectos que afetam diretamente o desenvolvimento (Jones et al, 1997).

Na natureza, a maioria das larvas de peixes e crustáceos se alimenta de organismos fitoplancctônicos e zooplancctônicos (Conceição et al., 2010; Das et al., 2012). Na maioria dos empreendimentos aquícolas, graças ao domínio da técnica de cultivo em massa, rotíferos e náuplios recém-eclodidos de *Artemia* são usados como alimento vivo para os primeiros estágios larvais de peixes e crustáceos

Artemia é um microcustáceo branquiópodo encontrado em ambiente aquático de elevada salinidade. A produção mundial de cistos de *Artemia*. dependente da coleta em ambiente natural, onde mais de 90% provém do Great Salt Lake, EUA (Conceição et al., 2010; Das et al., 2012). Por serem extraídos do ambiente natural, suas populações estão sujeitas às variações ambientais, sobretudo climáticas e infecções virais. Estes fatos levam a grande variação nas safras anuais, elevando o preço no mercado, e à restrição

na importação de cistos provindos de locais contaminados por vírus (Lavens e Sorgeloos, 1998; Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999).

De acordo com Nuñez et al. (2002), o sucesso na larvicultura do camarão marinho *L. vannamei* está condicionado à oferta de um alimento vivo de qualidade, com grande quantidade de PUFA e um tamanho corpóreo ideal para a captura e ingestão pelas larvas. Copépodos já foram testados substituto parcial ou total dos náuplios de *Artemia* em larviculturas de camarões peneídeos (D'Abramo et al. 2006; Farhadian et al. 2009). Fleeger (2005) cita várias vantagens do uso de copépodos no cultivo de peixes marinhos, tais como seus movimentos em zig-zag, que constituem um estímulo visual para as larvas, alto conteúdo energético, predomínio de fosfolipídios sobre os triglicerídeos, alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e outros compostos essenciais, como carotenos. Além disso, possuem antioxidantes naturais para a proteção e disponibilidade dos PUFA, níveis enzimáticos altos, que ajudam a digestão larval, e grande variedade de tamanho corporal entre o náuplio (50 μm) e o adulto (1 mm).

Lima e Souza-Santos (2007) testaram a ingestão dos diferentes estágios larvais de *L. vannamei* sobre a prole do copépodo *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco (1973) e demonstraram que os estágios de pós-larva 1 a 5 possuem uma alta taxa de ingestão de copépodos quando comparados aos náuplios de *Artemia*.

O cultivo de copépodos harpacticóides bentônicos, principalmente dos gêneros *Tisbe* e *Tigriopus* é fácil, uma vez que os copépodos apresentam alta fecundidade, curto tempo de geração, limites extremos de tolerância às mudanças ambientais, ampla variedade de alimento e alcance de altas densidades populacionais (Kahan et al., 1981-1982; Lavens e Sorgeloos, 1996). Trabalhos de cultivo já foram desenvolvidos para o copépodo *T. biminiensis*. Souza-Santos et al. (2006), ao estudarem o crescimento populacional dessa espécie em volume de 500 ml, constataram uma taxa de crescimento elevada de $0,33 \text{ dia}^{-1}$, uma capacidade de suporte de 67200 indivíduos e uma densidade de 205 indivíduos/ml. Ribeiro e Souza-Santos (2011), ao realizarem o cultivo em massa do copépodo *T. biminiensis*, em volume 5 L, verificaram uma produção média de prole (náuplios e copepoditos) de cerca de $7.000 \text{ ind. L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Tendo em vista a necessidade de desenvolver alimentos alternativos para a larvicultura do camarão *L. vannamei*, de forma a ter uma tecnologia menos dependente

dos cistos de *Artemia*, o objetivo desse estudo foi desenvolver técnicas de cultivo em massa do copépodo *Tisbe biminiensis* e avaliar o seu uso como substituto parcial ou total da *Artemia* na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

2. Hipóteses

O cultivo em massa de *Tisbe biminiensis* em volumes de 15 L é capaz de fornecer quantidades maiores de prole quando comparada aos cultivos de cinco litros, facilitando seu uso na alimentação de larvas carnívoras de espécies marinhas.

O uso de rações mais baratas que a ração para peixes ornamentais tornará o cultivo em massa do copépodo economicamente mais viável.

A substituição de náuplios de *Artemia* por náuplios e copepoditos de *T. biminiensis* na alimentação das larvas de *L. vannamei* promoverá aumento no crescimento e na sobrevivência.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

- ✓ Desenvolver técnicas de cultivo em massa do copépodo *T. biminiensis* em volumes de 15L.
- ✓ Avaliar a da prole de *T. biminiensis*, composta por náuplios e copepoditos, como substituta total ou parcial dos náuplios de *Artemia* sp. na alimentação de pós-larvas (PL1 a PL10) do camarão marinho *L. vannamei* em termos de crescimento, resistência ao estresse salino e sobrevivência.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Comparar o crescimento populacional dos copépodos *T. biminiensis* alimentados com ração comercial para peixes ornamentais (controle), ração artesanal para beijupirá (*Rachycentron canadum*), ração comercial pós-larvas e alevinos de

peixes onívoros, ração comercial para pós-larvas de camarões marinhos e ração comercial para peixes marinhos.

✓ Desenvolver técnicas para renovação de água e coleta da prole nos cultivos do copépodo *T. biminiensis* em volumes de 15 L.

✓ Comparar o comprimento, o peso, a sobrevivência e tolerância ao estresse salino de pós-larvas de *L. vannamei* alimentadas com a prole de *T. biminiensis* em diferentes níveis de substituição de náuplios de *Artemia*: 0, 50 e 100 %.

4. Capítulo I

Artigo publicado em:

Blue Biotechnology Journal v.4 n.2: 583-593, 2013 ISSN: 2163-3886

Nova Science Publishers, Inc.

MASS CULTURE OF THE HARPACTICOID COPEPOD *TISBE* *BIMINIENSIS* FED INERT DIETS

Aurelyanna C. B. Ribeiro* and Lília P. Souza-Santos

Departamento de Oceanografia, CTG,
Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

4.1. ABSTRACT

The purpose of this study was to improve the culture techniques and test different diets for the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. *T. biminiensis* was cultured in plastic trays with 15 L of seawater. The tested diets were: Alcon Basic[®] (control diet – CD); an experimental diet for *Rachycentron canadum* juveniles Op0 (ED); a commercial diet for post-larvae and fingerlings of omnivorous fish Nutripeixe AL55[®] (FD); and a commercial diet for post-larvae of marine shrimp Camaronina CR1[®] (MSD). The ED diet differed from the control by exhibiting a decrease of 47% of offspring production during the exponential phase of population growth. The MSD diet was poorer in comparison to the control diet both in total numbers (less 12,5 %), during the stationary phase, as well as in offspring production (less 38%). The FD performance was similar to the control diet. The results of the daily production (9,000 ind. L⁻¹ or 364,864 ind. m²) and the satisfactory acceptance of the different diets make production

* Author for correspondence: Tel: +55 81 2126-7218; fax. +55 81 2126-8227. E-mail: aurelyanna@gmail.com (A.C.B. Ribeiro), liliapssantos@gmail.com (L.P. Souza-Santos)

feasible and can allow the continuous production *T. biminiensis* to be tested as live feed in marine larvicultures.

Keywords: Harpacticoid; continuous production of copepods; live food; offspring production

4.2. Introduction

In the majority of aquaculture systems, mass culture techniques depend on the use of rotifers and *Artemia* nauplii as live feed for larval stages of fish and crustaceans [1]. However, these live prey generally have low nutritional quality and, in some cases, inappropriate size. In contrast, copepods offer excellent nutritional quality, a high degree of digestibility and an adequately small size and are an important food source for larvae, post-larvae and juveniles of fish and crustaceans in the marine environment [2-4].

Drillet [4] suggest that some copepods have a greater mass culture potential due to lifecycle characteristics such as high population growth and low mortality rates. Thus, some copepods from the orders Calanoida and Harpacticoida are excellent candidates for mass cultures. Calanoid copepods offer the advantages of exhibiting a pelagic lifecycle and some have resting eggs. However, many calanoids do not reach high densities and therefore need to be cultivated in large (> 1000 L) volumes to attain high numbers. On the other hand, harpacticoid copepods reach high densities and may be cultivated in smaller volumes, but their benthic habitat may restrict their access for pelagic larvae [5-9]. Fleeger [10] cites a number of advantages of the use of harpacticoid copepods in marine fish farms, such as their zigzagging movements, which serve as a visual stimulus for larvae. Their high energy content and high content of polyunsaturated fatty acids and other essential compounds, such as carotene, as well as the considerable variety in body size between nauplii and adults are also addressed as important.

Aquaculture firms and the aquarium trade are in urgent need of copepods to accompany their rapid development [4]. In the search for new live feed in farming systems involving carnivorous species, the harpacticoid copepod *T. biminiensis* Volkmann-Rocco [11] is a promising candidate due to its relatively easy culture and satisfactory offspring production [12]. Lima [13] studied the fatty acid composition of

T. biminienis feed ration and microalgae and concluded that they can convert fatty acid C18:0 into chains with 20 unsaturated carbons and present essential fatty acids. However, as some of them are present in low levels, the authors also suggested the use of better quality diet or enrichment before offer them to fish larvae. Lima and Souza-Santos [14] tested the use of *T. biminienis* offspring to feed the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* and found that postlarvae stages 1 to 5 exhibited a higher ingestion rate of copepods compared to *Artemia* nauplii. Willadino et al. [15] evaluated the ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi*, showing that *T. biminienis* combined with enriched *Artemia* metanauplii was the best diet during the first two weeks of life.

Basic studies on physiology and culture have been carried out for the copepod *T. biminienis* [16, 17, 18] and found a high growth rate of 0.33 day^{-1} . Ribeiro and Souza-Santos [12] performed the mass cultivation of *T. biminienis* in trays using the volume of 5-L feeding them microalgae and a ration for ornamental fish and obtained high and continuous offspring production of approximately $7,000 \text{ ind. L}^{-1}.\text{day}^{-1}$.

According to Rhodes and Boyd [19], expenditures related to algal culture for feeding purposes increase the labor and costs involved in the culture of copepods; the authors suggested the use of formulated diets to feed copepods. According to Norsker and Støttrup [20] some species of copepods can bioconvert fatty acids, allowing the use of cheaper, more accessible diets, such as flours or yeasts.

Thus the purpose of this study was to improve the culture techniques for *T. biminienis* compared to that published by Ribeiro and Souza-Santos [12], testing the use of cheaper diets commonly used in fish and shrimp farming systems. The following hypotheses will be tested: 1) the increase in surface (twice) and volume of cultures (three times) will result in higher production of organisms due to the greater availability of space; 2) copepods will grow well independently of the inert diets used without microalgae.

4.3. Materials and Methods

T. biminienis was cultured in 40-L transparent polyethylene plastic trays with an area of 0.37 m^2 ($88.3 \times 41.9 \times 15.2 \text{ cm}$) containing 15 L of filtered seawater at room temperature (26 to $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$), salinity of 35 ± 2 and constant aeration. The trays were

arranged on a slightly inclined workbench to facilitate the outflow of the contents through the drain during water exchanges and offspring collection. Complete water exchange, offspring collection, population sampling and feed were performed every two days. Within this time interval, the water quality was measured with a multi-parameter meter (YSI 556, Yellow Springs Instruments, USA).

Following the opening of the drain, the total content of the tray was emptied and poured through two sieves with mesh sizes of 250 and 63 μm . Adults were retained on the 250 μm mesh and most of the offspring (nauplii and copepodites) was retained on the 63 μm mesh. The mesh size was based on the body size of copepod that varies from 70 to 600 μm [16, 18]. The contents of each sieve were individually sub-sampled to estimate the offspring (63 μm sieve) and total number of copepods (the sum of 250 and 63 μm sieves) in trays. The contents of each sieve were deposited in a graduated bucket and completed to achieve 4 L of seawater. Next three subsamples per sieve content were removed with a 10-mL sampler, after manual vigorous homogenization of the contents with a plastic stick, and fixed in a 4% formalin solution and stained with rose Bengal, to facilitate counts. The specimens were classified under a stereomicroscope as nauplii, copepodites (including adults) and ovigerous females, as for this genera sex determination is difficult as they have no antennules differentiation. Only the contents retained on the 250 μm mesh were then returned to trays to be cultured and fresh seawater and 1 g of the respective diet were added.

Two experiments were conducted to test the following inert diets: Alcon Basic[®], a commercial ration for ornamental fish served as flakes used as the control diet (CD) due to its use in previous studies [18, 12]; an experimental diet (ED) for cobia *Rachycentron canadum* juveniles Op0 (ranging from 0.4 to 1mm) [21]; a commercial diet for post-larvae and fingerlings of omnivorous fish Nutripeixe AL55[®] (grain size of 0,4mm) - Fish Diet (FD) (Purina, Brazil); and a commercial diet for post-larvae of marine shrimp Camaronina CR1[®] (ranging from 0.4 to 1mm) - Marine Shrimp Diet (MSD) (Purina, Brazil). ED and MSD were ground up to transform the pellet into bran before adding it to the trays due to their coarser granulometry.

In the first experiment, CD was compared to ED and FD and in the second experiment, CD was compared to the MSD, due to space restrictions to test all diets together. Prior to the start of the experiments, copepods were acclimated to new diets

for a week. Each diet was performed with four replicate trays. Both experiment lasted 30 days.

The population growth rate in the different treatments was determined using simple linear regression analysis between time and the log of the total number of individuals until the first population peak, the exponential phase. The slopes of the regressions were analyzed and, when parallel, were compared using analysis of covariance (ANCOVA). One-way repeated-measure analysis of variance (RM-ANOVA) was used to compare diets using: 1 - The total number of copepods in the cultures during the population stabilization period; 2 - The offspring production at the exponential and the stabilization phases. Tukey's HSD test was used for paired comparisons of different means when significant differences ($p < 0.05$) were found among treatments [22].

4.4. Results

In the first experiment, water quality was: temperature $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$, pH 8.1 ± 0.2 , dissolved oxygen 6.2 ± 0.3 and salinity 34 ± 2 . The total number of individuals and percentage of offspring in relation to total number followed the same pattern throughout the experimental period with the three diets. The mean proportion of offspring harvested per treatment was 81.0% with the CD, 67.5% with the ED and 69.0% with the FD. The duration of the exponential phase was until the 10th day of culture in all three treatments (Figure 1.1).

Significant linear relationships were identified between time and the log of the total number of copepods in each treatment during the first ten days (the exponential phase) (Table 1.1).

The comparison of regression lines revealed no significant differences among the three diets (ANCOVA, $F = 0.6952$, $p = 0.5250$). Moreover, during the stationary phase no significant differences were found in the total number of copepods in the cultures among the three diets (one-way RM-ANOVA, $F = 1.603$, $p = 0.229$).

The greatest number of offspring produced occurred on the 10th day of culture with the CD. The highest production with the other diets was recorded on Day 12 with the FD and Day 24 with the ED.

Significant differences were found in the number of offspring produced in each treatment until the 10th day of culture (one-way RM-ANOVA, $F = 4.122$, $p = 0.049$). Tukey's test indicated that offspring production in the CD treatment was significantly greater than in the ED treatment ($p = 0.043$), whereas no significant differences were found between CD and FD treatments ($p = 0.210$) or between ED and FD treatments ($p = 0.59$). From 12 days of culture onwards, no significant differences in offspring production were found among the three diets (one-way RM-ANOVA, $F = 0.126$, $p = 0.883$). Mean production from this period until the end of the experiment was 18,000 ind. L⁻¹ or 729,729 ind. m⁻² every two days.

Table 1.1. Parameters of regression analysis ($Y = a + bX$) between log time (X) and total number of *Tisbe biminiensis* (Y) during the population growth phase in both experiments.

<i>Treatments</i>	<i>Slope ± SE</i>	<i>Intercept ± SE</i>	<i>r² (%)</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
First experiment					
CD	0.08048 ± 0.003991	5.06635 ± 0.024169	0.99	406.59	< 0.0001
ED	0.08876 ± 0.019593	4.88961 ± 0.118644	0.83	20.52	= 0.0105
FD	0.06459 ± 0.014498	5.15425 ± 0.087792	0.83	19.85	= 0.0119
Second experiment					
CD	0.04363 ± 0.003282	5.32649 ± 0.012281	0.98	176.70	= 0.0056
MSD	0.03617 ± 0.012018	4.88193 ± 0.184883	0.69	9.05	= 0.0395

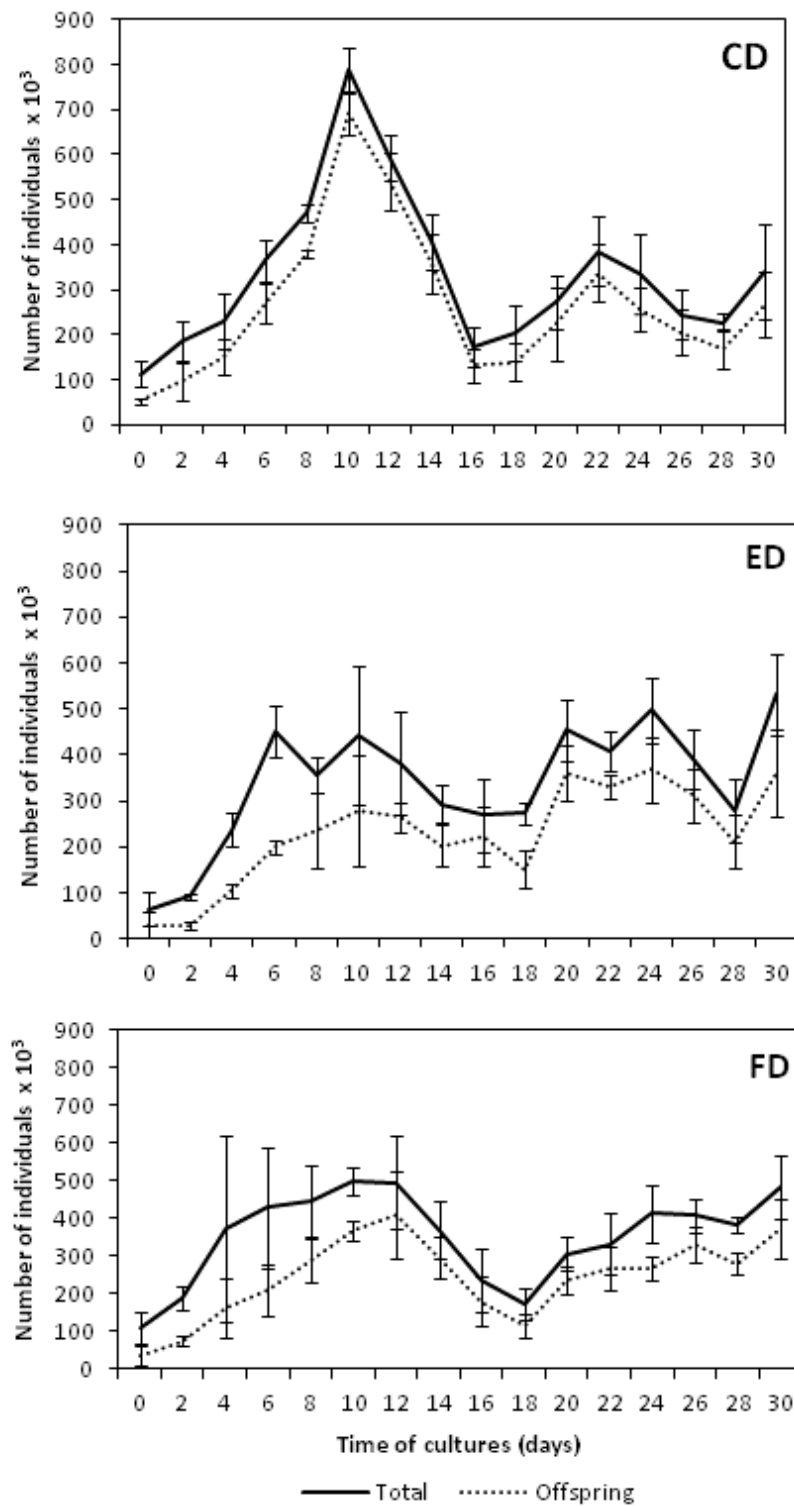


Figure 1.1. Means and standard deviation ($\pm$ SD) of the total number and offspring of the *Tisbe biminiensis* harvest in 15 L cultures throughout the 30 days with the three diets (CD – Control Diet; ED – Experimental Diet and FD – Fish Diet).

In the second experiment, water quality was as follows: temperature 28.5 ± 1.5 °C, pH 8.1 ± 0.2 , dissolved oxygen 6.2 ± 0.3 mg L⁻¹ and salinity 33 ± 2.5 . The total number of individuals and percentage of offspring in relation to total number followed similar patterns in both treatments. The mean percentage of offspring was 79.53% with CD and 75.8% with MSD (Figure 1.2).

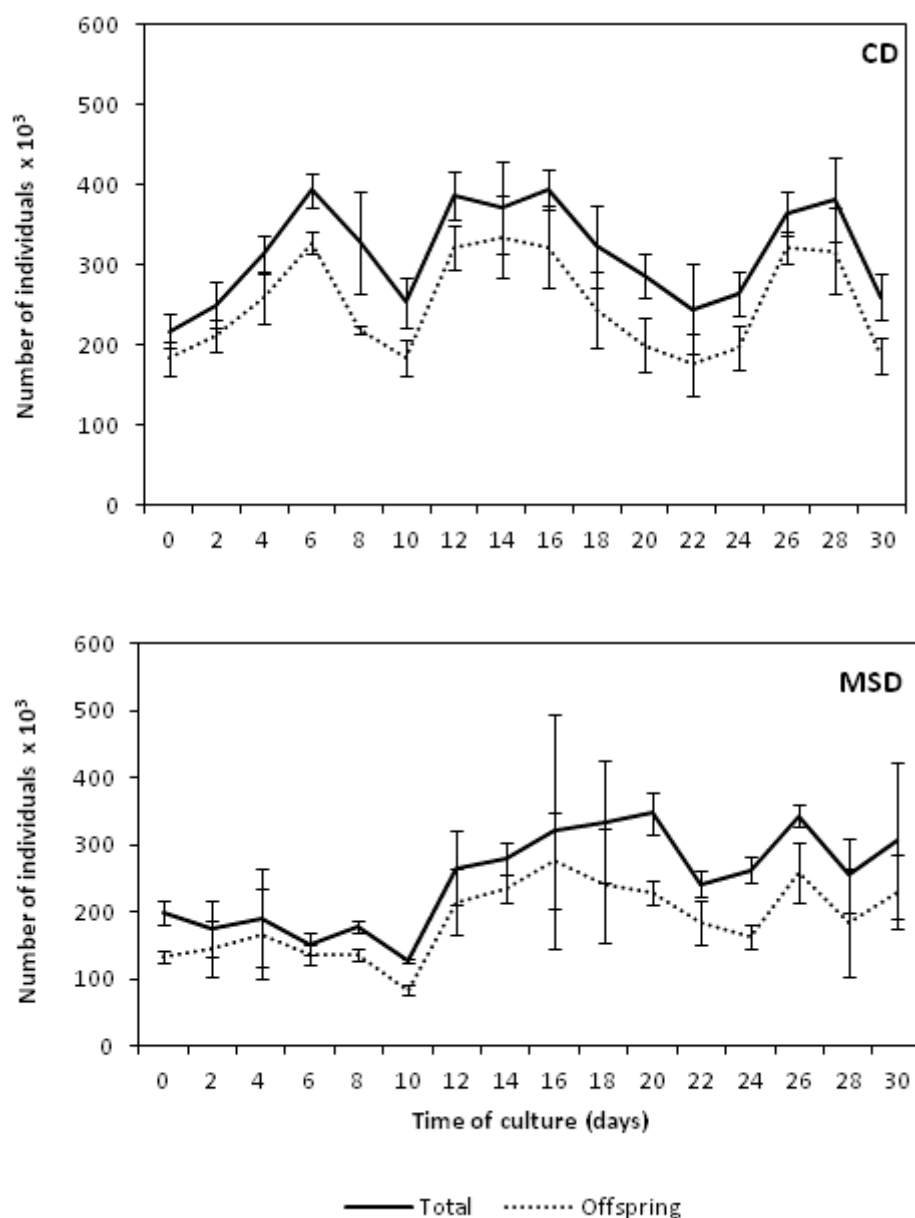


Figure 1.2. Means and standard deviation ($\pm$ SD) of the total number and offspring of the *Tisbe biminiensis* harvest in 15 L cultures throughout the 30 days with the two diets (DC – Control Diet and MSD – Marine Shrimp Diet).

The exponential population growth occurred until the sixth day of culture in the CD treatment. In the MSD treatment, a lag phase was found from the beginning to the 10th day of culture and the exponential phase only occurred between Days 10 and 20. The linear regression analysis relating time and the log of the total number of copepods in the two treatments during the exponential phase is significant (Table 1.1). The regression lines were parallel and not significantly different (ANCOVA, $F = 0.1554$, $p = 0.7116$). A significant difference was found in the mean number of individuals in the cultures during the stationary phase (one-way RM-ANOVA, $F = 8.731$, $p = 0.042$), with a greater number in the CD treatment.

The greatest number of offspring produced occurred on the 14th day in CD treatment and on Day 16 in MSD treatment. Significant differences were found in the number of offspring produced until Day 14 (one-way RM-ANOVA, $F = 43.225$, $p < 0.001$), indicating that the CD diet resulted in greater production of offspring. No significant differences in offspring production were found during the stationary phase (one-way RM-ANOVA, $F = 1.557$, $p = 0.252$).

Comparing the performance of CD diet between both experiments, greater population growth occurred in the first experiment, as the slope of the regression indicated (Table 1.1). But during the stationary phase, no statistically significant difference was found in the total number of copepods in cultures (one-way RM-ANOVA, $F = 0.00562$, $p = 0.942$). Moreover, no significant differences were found in offspring production at the exponential (one-way RM-ANOVA, $F = 0.177$, $p = 0.692$) or at the stationary phase (one-way RM-ANOVA, $F = 0.694$, $p = 0.432$).

Table 1.2. displays the summary of ideal conditions for the cultivation of *T. biminiensis* based on knowledge acquired from the mass culture studies on this species.

Table 1.2. Proposed protocol for mass culture and offspring collection of the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*.

Culture size	<i>Ideal conditions</i>
	5 to 15 L (0.37 to 0.15m²)
Water temperature (°C)	29 ± 2
Salinity	34 ± 2
DO (mg L ⁻¹)	6 ± 1
Photoperiod (h:h)	12:12
Feeding	1g/day of ground feed (adjust to consumption) Microalgae can be used every two days
Water exchange	Complete every 2 or 3 days (64 µm sieves)
Collection of offspring	Every other day (250 and 64 µm sieves)

4.5. Discussion

The mass cultures of *Tisbe biminiensis* grow well on the four inert diets tested without microalgae, though some differences in production could be detected among diets. The ED diet differed from the CD by producing less offspring during the exponential phase of population growth. MSD achieved poorer results in comparison to CD both in total numbers during the stationary phase as well as in offspring production during the exponential phase. Moreover, the MSD exhibited a lag phase at the beginning of the population growth phase, which was not seen among the other diets. The ED and MSD treatments were also those that left more food debris in the seawater. According to Drillet et al. [4], residues left by the use of flours and yeasts as feed in copepod farming systems may exert a negative effect on water quality, favoring the uncontrolled growth of heterotrophic bacteria and the development of pathogenic micro-organisms. When present in a disharmonious manner in cultures, these micro-organisms

compete with copepods, which may have a negative effect on production. Thus, the abnormal development of bacteria may have affected the results.

Regarding the performance of the control diet (CD), greater population growth occurred in the first experiment. During this experiment, mean temperatures were higher ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and less variable compared to those recorded during the second experiment. This finding suggests that lower temperatures may have caused delayed development in the cultures as proposed in other studies [23].

The offspring production in a bottom surface area of 0.37 m^2 during the first experiment ($729,729\text{ ind. m}^{-2}$ every two days, regardless of the diet) was lower than the daily production reported by Stottrup and Norsker [24] for *T. holothuriae* ($1,250,000\text{ nauplii.m}^{-2}$) in 0.24 m^2 trays and very similar to the production reported by Sun and Fleeger [25] for *Amphiascoides atopus* ($720,000\text{ ind. m}^{-2}$) in 4 m^2 collected every two days. Ribeiro and Souza-Santos [12] estimated the offspring production in two or four culture recipients of 0.15 m^2 , such that a single recipient would only be collected a second time after an interval of four to six days. If one considers that the offspring collection from a single recipient was done every four days, the daily production per tray in the study by Ribeiro and Souza-Santos [12] ($233,100\text{ ind. m}^{-2}$) was lower than the daily production per tray found in the present study ($364,864\text{ ind. m}^{-2}$). These results suggest that factors such as increase of area, frequency of water exchange and removal of the offspring contribute toward an increase in copepod production in the culture system proposed in the present study.

Regarding production efforts and cost reductions, the modification of the plastic recipients with the addition of a drain led to a reduction in collection time and effort (six recipients could be cleaned and sampled in one hour of work) in comparison to the study carried out by Ribeiro and Souza-Santos [12]. The use of relatively small plastic recipients for the mass culture of benthic copepods seems to be an adequate, low-cost alternative that is easy to manage, especially in locations with a limited amount of available space. The increase of copepod production, to satisfy larval needs, should be attained by increasing the number of trays used for culture.

Previous studies comparing diets based on microalgae and alternative diets regarding aspects such as fertility, survival and population growth have also demonstrated that microalgae are not fundamental items in the diet of some harpacticoid

copepods. Carli et al. [26] compared the performance of *Tigriopus fulvus* cultured on the microalga *Monocrysis lutheri* and on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and found that the latter group exhibited better survival and fertility, although the production of nauplii per female was lower and the production period was longer. Rhodes and Boyd [19] tested the effect of a diet formulated with linseed oil on the culture of *Nitokra lacustris* and found a population growth rate of 7.5% compared to 6.3% when the species were fed the microalga *Tetraselmis suecica*. Considering these results it could be suggested that *T. biminiensis* culture does not necessarily require microalgae, so producers can feed them with the same type of feed administered to their end product. This strategy will reduce production costs and the need for qualified labor, which are required in the production of microalgae.

The results of the present study for *T. biminiensis* enable the continuous production of this species for future testing as an alternative to rotifers and *Artemia* in marine larviculture. The level of offspring produced however, is not yet sufficient to meet the higher demands of large fish but may be useful for ornamental aquaculture, an increasing sector in world economy.

4.6. Conclusion

The mass culture of the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* in plastic trays with 15L of seawater renewed every other day for offspring collection, increased copepod production level attained in previous studies. All four inert diets tested result in population growth, although the two commercial rations for fish resulted in greater production. The experimental diet and shrimp ration also produced a large number of copepods to be used as live feed in larvicultures.

4.7. Acknowledgments

The authors wish to extend their gratitude to the Brazilian agencies CNPq and CAPES for supporting this study; the firm Aqualider, especially Manuel Tavares, for providing the space for the cultivation experiments; Drs. Ronaldo Cavalli, Ralf Schawnborn and Eudes Correia for their helpful suggestions regarding the manuscript; and Nancilda Barros for her assistance in the counts.

4.8. References

- [1] C. J. Cutts, "Culture of harpacticoid copepods: potential as live feed for rearing marine fish", *Adv. Mar. Biol.* 44 (2003) 295-316.
- [2] O. O. Ajiboye, A.F. Yakubu, T.E. Adams, E.D. Olaji, N.A Nwogu, "A review of the use of copepods in marine fish larviculture", *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 21 (2011) 225-246.
- [3] G. Drillet, N.O.G. Jørgensen, T.F. Sørensen, H. Ramløv, B.W. Hansen, "Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as relevant live feed organisms in marine larviculture", *Aquac. Res.* 37 (2006) 756-772.
- [4] G. Drillet, S. Frouël, M H. Sichlau, P.M, Jepsen, J.K. Højgaard, A. K. Joarder, B.W. Hansen, "Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed", *Aquaculture* 315 (2011) 155-166.
- [5] G. Drillet, P. M. Jepsen, J.K. Højgaard, N.O.G. Jørgensen, B.W. Hansen, "Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: Life history traits and biochemical contents of eggs and adults", *Aquaculture* 279 (2008) 47-54.
- [6] K. W. Lee, H. G. Park, S. M. Lee, H. K. Kang, "Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov", *Aquaculture* 256, 1-4 (2006) 346-353.
- [7] I. Olivotto, A.M. Avella, G. Sampaolesi, C.C. Piccinetti, P. Ruiz Navarro, O. Carnevali, "Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies", *Aquaculture* 283 (2008) 92-96.
- [8] A. C. Puello-Cruz, S. Mezo-Villalobos, B. Gonzalez-Rodriguez, D. Voltolina, "Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets", *Aquaculture* 290 (2009) 317-319.
- [9] J. G. Støttrup, "A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. Advantages and disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoid copepods. Avances en Nutrición Acuicola VIII. Memorias del Octavo Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, Mazatlán, Sinaloa, México 2006, pp. 62-83.
- [10] J. W. Fleeger, The potential to mass-culture Harpacticoid copepods for use as food for larval fish, In: C.S. Lee, P.J.O. Bryen, N.H. Marcus, (Eds.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell, UK, 2005, pp. 11-24.

- [11] B. Volkmann-Rocco, “*Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the *Gracilis* group”, *Arch. Oceanogr. Limnol.* 18 (1973.) 71-90.
- [12] A. C. B. Ribeiro, L.P. Souza-Santos, “Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*”, *Aquaculture* 321 (2011) 280-288.
- [13] L. C. M. Lima, D. Navarro, L. P. Souza-Santos, “Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*”, *J. Crustac. Biol.* 33, 10 (2013) 372-381.
- [14] L.C.M. Lima, L.P. Souza-Santos, “The ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae as a function of *Tisbe biminiensis* copepod concentration”, *Aquaculture*, 271 (2007) 411-416.
- [15] L. Willadino, L.P. Souza-Santos, R.C.S. Mélo, A.P. Brito, N.C.S. Barros, C.M.V. Araújo-Castro, D.B. Galvão, A. Gouveia, C.G. Regis, R.O. Cavalli, “Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items”, *Aquaculture* 360-361 (2012) 10-16.
- [16] C. S. C. Pinto, L.P. Souza-Santos, P.J.P. Santos, “Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (COPEPODA- HARPACTICOIDA) reared on different diets”, *Aquaculture* 198 (2001) 253-267.
- [17] C. M. V. Araújo-Castro, L.P. Souza-Santos, “Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*?”, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327 (2005) 58-69.
- [18] L. P. Souza-Santos, J.M.O. Pastor, N.G. Ferreira, W.M. Costa, C.M.V. Araújo-Castro, P.J.P. Santos, “Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses”, *Aquac. Res.* 37 (2006) 1516-1523.
- [19] A. Rhodes, L. Boyd, Formulated feeds for harpacticoid copepods: implications for population growth and fatty acid composition. In: C.S. Lee, P.J.O. Bryen, N.H. Marcus, (Eds.), *Copepods in aquaculture*. Blackwell, UK, 2005, pp. 151-168.
- [20] N. H. Norsker, J. G. Støttrup, “The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes”, *Aquaculture*, 125 (1994) 155-166.
- [21] R. F. Silva Júnior, W.V. Nova, J.L. Farias, C.N. Costa-Bomfim, M.B. Tesser, J.I. Druzian, E.S. Correia, R.O. Cavalli, “Substituição do óleo de peixe por óleo de soja em dietas para beijupirá (*Rachycentron canadum*)” *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63, 4 (2011) 980-987.

- [22] J. H. Zar, Biostatistical Analysis, Prentice-Hall, 1999.
- [23] T. D. Williams, M.B. Jones, “Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida)”, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 183 (1994) 283-298.
- [24] J. G. Støttrup, N.H. Norsker, “Production and use of copepods in marine fish larviculture”, *Aquaculture* 155 (1997) 231-247.
- [25] B. Sun, J. W. Fleeger, “Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system”, *Aquaculture* 136 (1995) 313-321.
- [26] A. Carli, G. L. Mariottini, L. Pane, “Influence of nutrition on fecundity and survival in *Tigriopus fulvus* Ficher (Copepoda: Harpacticoida)”, *Aquaculture* 134 (1995) 113-119.

Received 10 November 2013; accepted in final form 8 December 2013.

5. Capítulo II

Utilização de dieta formulada para peixes marinhos na produção de prole do copépodo Harpacticoida *Tisbe biminiensis*

5.1. Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de uma ração comercial para peixes marinhos sobre a produção de prole do copépodo *Tisbe biminiensis*. O cultivo dos copépodos foi realizado em volume de 15L em bandejas plásticas de 0,37m² adaptadas com drenos para facilitar a troca de água e coleta da prole, que foram feitas três vezes por semana. Utilizando-se análise de variância com medidas repetidas (RM-ANOVA), a ração Controle Alcon Basic[®] (RC) foi comparada a ração teste - ração comercial para peixes marinhos NRD 5/8, INVE (RT). Durante o período experimental, a produção de prole obtida com a RT não diferiu da produção obtida com a RC ($p = 0.2987$). Foram produzidos em média 7.400 ind. L⁻¹. dia⁻¹ ou 300.000 ind. m², quantidade semelhante a obtida em estudos anteriores. Desta forma concluímos que a produção de prole de *T. biminiensis* não foi influenciada pelo tipo da ração utilizada, o que confirma a fácil adaptação desta espécie a este tipo de alimento inerte.

5.2. Introdução

O sucesso do cultivo de peixes e crustáceos está intrinsecamente ligado à obtenção de larvas de boa qualidade. Um dos fatores essenciais para que se garanta essa boa qualidade larval está relacionado à alimentação, sobretudo dos primeiros estágios larvais, onde se deve garantir o fornecimento de um alimento com qualidade nutricional, tamanho adequado e em quantidade suficiente.

Ainda hoje, na maioria dos empreendimentos aquícolas, sobretudo graças ao domínio da técnica de cultivo em massa, rotíferos e náuplios recém-eclodidos de *Artemia* são usados como alimento vivo para os primeiros estágios larvais de peixes e crustáceos. Porém, geralmente, estas presas vivas apresentam uma baixa qualidade nutricional e, em alguns casos, tamanho inadequado (Ajiboye et al., 2011; Cutts, 2003; Drillet et al., 2011; Olivotto et al., 2003; Olivotto et al., 2005; Sargent et al., 1999).

Quando comparados aos rotíferos e *Artemia*, copépodos se destacam devido ao seu excelente valor nutricional, alta digestibilidade e seu pequeno tamanho e, além disso, no ambiente marinho os copépodos representam uma importante fonte de alimento para larvas, pós-larvas e juvenis de peixes e crustáceos, provavelmente atendendo às exigências nutricionais destes diferentes organismos (Ajiboye et al., 2011;

Drillet et al., 2006; Drillet et al., 2011; Guangxing e Donghui, 2009; Sun e Fleeger 1995).

Trabalhos de cultivo em massa já foram desenvolvidos para o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco 1973. Ribeiro e Souza-Santos (2011) desenvolveram o cultivo em massa para *T. biminiensis* em recipientes de 5 L, alimentados com uma combinação de ração para peixes ornamentais e microalgas, e obtiveram uma produção de prole (náuplios e copepoditos) de cerca de 7.000 ind. L⁻¹. Ribeiro e Souza-Santos (2013) aprimoraram a técnica de cultivo em massa em volumes de 15 L para esta espécie, utilizando rações (comercial e artesanal) desenvolvidas para diferentes organismos aquáticos, sem a adição de microalgas. A produção diária obtida, 9.000 ind. L⁻¹, independeu do tipo de ração utilizada.

As empresas de aquicultura e o comércio aquarista estão necessitando urgentemente de copépodos para suprir seu rápido desenvolvimento (Drillet et al., 2011). Ribeiro e Souza-Santos (2013) determinaram que *T. biminiensis* aceita bem rações desenvolvidas para diferentes organismos aquáticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da ração comercial para peixes marinhos sobre a produção de prole do copépodo *T. biminiensis*.

5.3. Material e Métodos

O experimento foi realizado nas instalações do Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia da UFPE – LACE, onde copépodos *Tisbe biminiensis* são cultivados com sucesso há várias gerações desde 1998. A espécie foi coletada do sedimento da Praia do Farol em Olinda, Pernambuco, Brasil.

O cultivo foi feito em caixas plásticas transparentes de 40L, com área de 0,37 m² (88,3 x 41,9 e altura de 15,2 cm). Drenos foram adaptados ao fundo das caixas visando facilitar o escoamento durante as trocas de água. Em cada caixa, foram adicionados 15L de água do mar filtrada em temperatura ambiente (26 a 33°C), salinidade aproximada de 35. A aeração foi constante e o fotoperíodo natural de 13h luz/ 11h escuro foi mantido.

As dietas testadas foram: ração comercial para peixes ornamentais Alcon Basic[®] (Alcon Pet, Brasil), considerada como dieta controle (DC) devido a sua utilização em trabalhos anteriores (Souza-Santos et al., 2006; Ribeiro e Souza-Santos, 2011 e Ribeiro e Souza-Santos, 2013) e a dieta teste (DT) foi a ração para peixe marinho NRD 5/8,

(INVE, Bélgica). Para cada ração testada foram utilizadas três repetições e o experimento teve duração de 29 dias.

A troca de água, realizada três vezes por semana, foi feita a partir da abertura manual dos drenos. O conteúdo total das caixas foi escoado para um conjunto de peneiras com abertura de malha de 250 e 63 μm . Os copépodos adultos eram retidos na malha de 250 μm e a maior parte da prole, composta por náuplios e copepoditos, na malha de 63 μm . O conteúdo retido na peneira de 250 μm era devolvido para a caixa de cultivo, onde ocorreu a adição de água limpa e o fornecimento de 1 g de dieta, conforme o tratamento. Nos dias em que não ocorriam as trocas de água e foi observado o consumo total da ração fornecida, houve adição de mais um grama da dieta.

A quantidade de prole produzida foi estimada durante as trocas de água. O conteúdo retido na peneira de 63 μm era depositado em balde graduado com 4 L de água do mar. Após a homogeneização, três sub-amostras foram retiradas com um amostrador com capacidade de 10 ml. As sub-amostras foram fixadas em formol 4%, coradas com Rosa Bengala e, em microscópio estereoscópio, os espécimes foram classificados como náuplios e copepoditos (inclusive adultos).

A análise de variância com medidas repetidas (RM-ANOVA) foi utilizada, entre os tratamentos, para comparar as produções de prole ao longo de todo o período experimental (Zar, 1999).

5.4. Resultado e discussão

A produção de prole seguiu uma tendência bastante similar nos dois tratamentos ao longo do período experimental, apresentando fases de alta e de queda de produção em momentos muito semelhantes (Fig. 2.1).

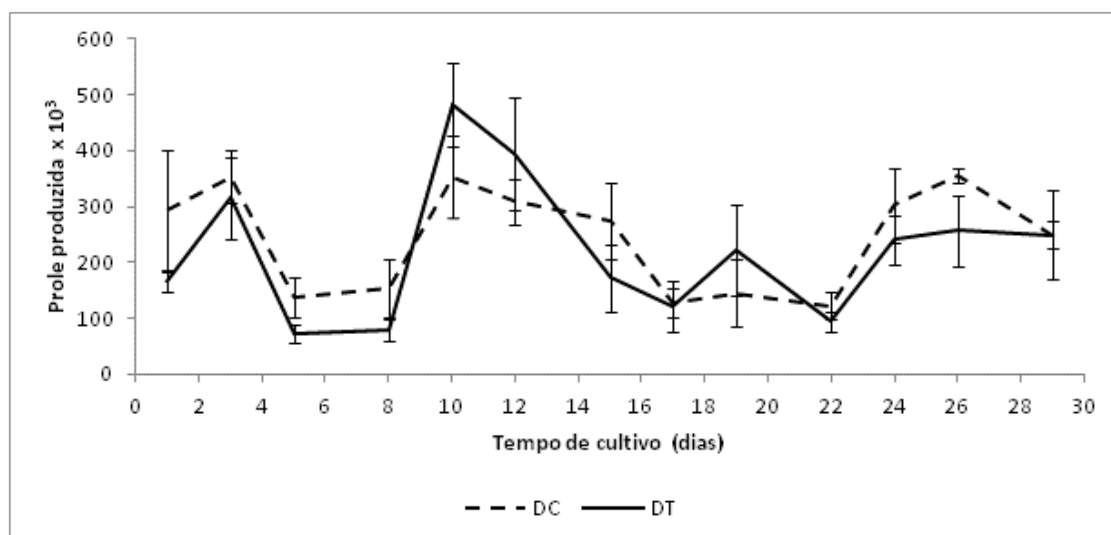


Figura 2.1- Médias ($\pm$ DP) da quantidade de prole de *Tisbe biminiensis* produzida em cultivos 15 L durante 30 dias utilizando duas dietas (DC – Dieta Controle e DT – Dieta Teste).

O primeiro pico de produção ocorreu no terceiro dia de cultivo, quando a produção média no tratamento DC foi 23.570 ind. L^{-1} e nos cultivos alimentados com DT foi de 20.995 ind. L^{-1} . No 10º dia de cultivo, após uma fase de declínio, foi registrada a mais alta produção, os cultivos alimentados com DT produziram uma média de 32.000 ind. L^{-1} . Após o primeiro pico de produção, a quantidade média de prole produzida até o final do experimento foi 7.400 ind. L^{-1} . dia $^{-1}$ ou 300.000 ind. m^2 . Ao longo de todo o período experimental, as diferenças na quantidade de prole produzida nos dois tratamentos não foram significativas (One-Way RM-ANOVA, $F = 1.180$, $p = 0.299$). Concluindo-se que a produção de prole de *T. biminiensis* não foi influenciada pelo tipo da ração utilizada, o que confirma a aceitação da espécie a este tipo de alimento inerte, conforme sugerido por Ribeiro e Souza-Santos (2013).

A quantidade de prole produzida na fase de estabilização dos cultivos, 7.570 ind. L^{-1} . dia $^{-1}$ (± 1.700), foi semelhante a produção descritas por Ribeiro e Souza-Santos (2011) (7.000 ind. L^{-1} . dia $^{-1}$) e Ribeiro e Souza-Santos (2013) (9.000 ind. L^{-1} . dia $^{-1}$), onde foram utilizadas técnicas de cultivo bastante semelhantes as empregadas neste trabalho. Stottrup e Norsker (1997) cultivaram *T. holothuriae* em bandejas de 0,24 m^2 a produção obtida foi de 100.000 náuplios L^{-1} . dia $^{-1}$, a mais alta já registrada para copépodos. Estudos realizados com diferentes espécies de *Tisbe* sugerem que uma maior frequência de renovação da água dos cultivos e retirada de prole promovam um

aumento no crescimento populacional (Fava e Crotti 1979, Gaudy e Guerin, 1982). Um ponto de diferenciação metodológica entre o trabalho de Stottrup e Norsker (1997) e os de Ribeiro e Souza-Santos (2011), Ribeiro e Souza-Santos (2013) e o presente estudo foi a frequência de renovação da água e da coleta de prole. No caso de Stottrup e Norsker (1997) a renovação da água e a coleta de indivíduos foram realizadas diariamente e nos demais trabalhos essa frequência variou de dois a quatro dias. Desta forma, sugerimos que, conforme a necessidade de obtenção de prole, as coletas sejam feitas com uma maior frequência de modo a se estimular a produção de prole para que esta possa vir atender a demanda requerida.

A utilização da prole de *T. biminiensis* como alimento para larvas carnívoras foi testada por Lima e Souza-Santos (2007), demonstrando que nos estágios de pós-larva 1 a 5 o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* apresenta uma alta taxa de ingestão deste copépodo quando comparados aos náuplios de *Artemia*. Willadino et al. (2012) avaliaram a taxa de ingestão, a sobrevivência e o crescimento do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, mostrando que a combinação de copépodos *T. biminiensis* com *Artemia* enriquecida foram essenciais para o crescimento e sobrevivência do *H. reidi* durante as duas primeiras semanas de vida.

Com base nos resultados obtidos, a quantidade produzida ainda não é suficiente para atender a demanda de grandes larviculturas, porém frente aos bons resultados apresentados por Willadino et al. (2012) a utilização de copépodos como alimento já pode ser pensada como uma real alternativa para produtores de espécies ornamentais, que trabalham em escala menor do que os produtores de espécies voltadas ao consumo humano. Acreditamos que na busca por novas fontes de alimentos vivos para as larviculturas, o copépodo *T. biminiensis* se mostra um promissor candidato, sobretudo pela satisfatória quantidade de dados levantados sobre esta espécie.

6. Capítulo III

**Uso do copépodo *Tisbe biminiensis* (Harpacticoida) como alimento vivo
para os primeiros estágios de pós-larva do camarão marinho
Litopenaeus vannamei (Penaeidae)**

6.1. Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da prole de *Tisbe biminiensis* como substituta dos náuplios recém-nascidos de *Artemia*, na alimentação das pós-larvas (PL1 a PL10) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Três tratamentos foram testados: T1 – Controle *Artemia*, T2 – Mix: *Artemia* + *T. biminiensis* e T3 – *T. biminiensis*. A sobrevivência no T1 foi significativamente maior em comparação com as demais (T1 100% > T2 52% = T3 51%). O comprimento larval foi significativamente maior no tratamento T2 (T2 7.9 mm > T1 7.1 mm = T3 6.8 mm) e não houve diferenças no peso seco. Os bons resultados alcançados em termos de crescimento e peso no T2 indicam que a combinação de alimentos melhora a qualidade das pós-larvas. A menor sobrevivência das pós-larvas de *L. vannamei* nos tratamentos T2 e T3 podem estar relacionada a fatores como predação, pelos copépodos, de pós-larvas debilitadas ou pela presença de bactérias patogênicas provindas dos cultivos de copépodos. Os resultados indicam que na ausência ou restrição de cistos de *Artemia* no mercado o cultivo de copépodos poderia vir a representar uma alternativa para as larviculturas desta espécie.

6.2. Introdução

O sucesso na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) está condicionado à oferta de um alimento vivo de qualidade, com grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e um tamanho corpóreo que permita a captura e ingestão pelas larvas (Nuñez et al., 2002). Na maioria dos empreendimentos aquícolas, graças ao domínio da técnica de cultivo em massa, rotíferos e náuplios recém-eclodidos de *Artemia* são usados como alimento vivo para os primeiros estágios larvais de peixes e crustáceos (Cutts, 2003). Porém, geralmente, estas presas vivas apresentam uma baixa qualidade nutricional, em alguns casos, tamanho inadequado e, além disso, sofrem grandes variações de custo de mercado (Ajiboye et al., 2011; Drillet et al., 2011; Farhadian et al., 2009; Olivotto et al., 2008; Olivotto et al., 2010; Sargent et al., 1997).

O interesse pelo uso de copépodos na aquicultura tem crescido desde a década de 1980 (Ajiboye et al., 2011). Entre as várias vantagens do uso de copépodos como alimento para larvas marinhas podemos citar: grande variedade de tamanhos corporais entre náuplios (50 µm) e adultos (1 mm); seus movimentos em zig-zag que constituem

um estímulo visual para as larvas; alto conteúdo energético; predomínio de fosfolipídios sobre os triglicerídeos; alto conteúdo de PUFA e outros compostos essenciais como carotenos; antioxidantes naturais para a proteção e disponibilidade dos PUFA; e níveis enzimáticos altos que ajudariam a digestão larval (Alvarez-Lajonchere e Molejon, 1998; Fleeger, 2005; França et al., 2010)

Poucos foram os estudos testando copépodos como alimento das larvas de camarões, sendo mais comuns testes com peixes marinhos, provavelmente devido à dificuldade de cultivar algumas larvas de peixes. D'Abramo et al. (2006) testaram o copépodo harpacticóide *Tisbe monozota* como substituto de náuplios de *Artemia* na alimentação de larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Os resultados mostraram que as larvas alimentadas com os copépodos não apresentaram diferenças no peso, comprimento e sobrevivência em relação às alimentadas com náuplios de *Artemia*. Farhadian et al. (2009) testaram a eficiência do copépodo ciclopóide *Apocyclops dengizicus* como alimento vivo para pós-larvas do camarão *Penaeus monodon*. As pós-larvas alimentadas com *A. dengizicus*, em combinação ou não com náuplios de *Artemia*, obtiveram uma maior sobrevivência e crescimento em relação às alimentadas apenas com náuplios de *Artemia*.

O copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco (1973) já foi testado como alimento para larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* por Lima e Souza-Santos (2007), mas estes analisaram apenas as taxas de ingestão da prole de *T. biminienis* e observaram que os estágios pós-larvas 1-5 exibiram taxas de ingestão mais elevadas de copépodos em comparação a náuplios de *Artemia*. Mais recentemente, Willadino et al. (2012) avaliaram a taxa de ingestão, a sobrevivência e crescimento de recém-nascidos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, mostrando que, durante as duas primeiras semanas de vida, o copépodo *T. biminiensis*, em combinação com náuplios de *Artemia* enriquecidos, foi a melhor dieta. Desta forma, estes estudos indicam que esta espécie de copépodo poderia vir a melhorar o desempenho na larvicultura de *L. vannamei*.

Diante da necessidade de se desenvolver alimentos vivos alternativos aos comumente usados, o objetivo desse estudo foi avaliar o uso do copépodo *T. biminiensis* como substituto parcial ou total dos náuplios de *Artemia* na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

6.3. Material e Métodos

6.2.1. Cultivo de microalgas

A microalga *Thalassiosira fluviatilis* foi cultivada no meio f/2 (Guillard, 1975) preparado com água do mar filtrada. A solução tampão Tris HCl (pH 7.7) e os nutrientes da solução estoque do meio f/2 (solução de silicato e nutrientes) foram adicionados a água do mar antes da esterilização em autoclave. A solução de vitaminas, esterilizada por filtração em membranas estéreis de 0,2 µm, foi adicionada ao meio antes da inoculação da alga. As culturas foram mantidas em temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro.

6.2.2. Cultivo e coleta de copépodos

Os copépodos foram cultivados de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro e Souza-Santos (2013). Os cultivos foram realizados em caixas transparentes de polietileno com capacidade para 40 L e superfície de área de 37 m² (88.3 x 41.9 x 15.2 cm) contendo 15 L de água do mar filtrada em temperatura ambiente (26 to 33°C), com salinidade de 35 e aeração constante. A coleta da prole foi realizada todos os dias, 24 h antes da primeira alimentação ser ofertada para as pós-larvas. A partir da abertura manual dos drenos, o conteúdo total das caixas de cultivo era direcionado para um peneiras com abertura de malha de 250 e 63 µm. Os adultos eram retidos na malha de 250 µm e a grande maioria da prole, composta por náuplios e copepoditos, na malha de 63 µm. O conteúdo retido na peneira de 250 µm foi devolvido para o recipiente de cultivo, onde ocorreu a adição de água limpa e fornecimento de 1g da ração para peixes marinhos NRD 5/8 (Inve Aquaculture, Bélgica). O conteúdo da peneira de 63 µm foi amostrado e depositado em caixas plásticas transparentes de 20 L contendo 4,5 L de água do mar filtrada. A prole coletada foi alimentada, durante 24 h, com 500 ml de suspensão de *T. fluviatilis* na concentração aproximada de $1,10 \times 10^5$ células / ml. Esse procedimento foi adotado visando promover o enriquecimento nutricional da prole e para que os restos de alimento, que são coletados junto com a prole do copépodo, fossem consumidos nesse período.

Para estimar o número de prole produzida, o conteúdo da peneira de 63 µm foi depositado em um balde graduado contendo 4 L de água do mar. Após a homogeneização do conteúdo, três sub-amostras foram removidas com um amostrador

de 10 ml, fixadas em solução de formalina a 4% e coradas com Rosa de Bengala para facilitar a contagem.

6.2.3. Avaliação do *Tisbe biminiensis* como alimento para pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*

As pós-larvas (PL) no estágio PL1 foram obtidas da empresa Potiporã localizada em Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. As pós-larvas foram transportadas em sacos plásticos de 5 L contendo aproximadamente 2,5 L de água de cultivo e oxigênio, os sacos foram acondicionados em caixas de papelão. Em laboratório as pós-larvas foram aclimatadas, por aproximadamente 1h até que a temperatura da água se igualasse a da condição experimental. Em seguida as PL foram quantificadas por amostragem e imediatamente estocadas, numa densidade de 60 PL L⁻¹ em baldes graduados com capacidade para 8 L preenchidos com 5 L de água do mar filtrada.

Três tratamentos em nível de substituição de náuplios *Artemia* foram testados com quatro repetições: Tratamento 1 - 0% substituição (Controle): pós-larvas foram alimentadas com náuplios recém-eclodidos de *Artemia*; Tratamento 2 - 50% substituição (Mix): as pós-larvas foram alimentadas com prole (náuplios e copepoditos) de *T. biminiensis* e náuplios *Artemia* e Tratamento 3 - 100% substituição (Copépodo): as pós-larvas foram alimentadas com prole de *T. biminiensis*.

A concentração do alimento vivo ofertado para as pós-larvas variou de acordo com a idade das pós-larvas (Tabela 3.1.). O protocolo alimentar utilizado foi baseado no adotado pela larvicultura da empresa Potiporã. A densidade de alimento vivo foi ajustada duas vezes por dia e fornecido a cada 12 horas. Para complementar a alimentação das pós-larvas, após a oferta da última alimentação, foi fornecido 0,5 g de ração específica para pós-larvas. As pós-larvas foram cultivadas do estágio PL 1 até o estágios PL 10 (dez dias após a metamorfose). Antes da primeira alimentação, a renovação da água dos cultivos foi feita numa taxa de 60% dia⁻¹, usando uma malha de 500 µm a fim de eliminar mudas, detritos e restos de alimento. A aeração foi mantida constante, com fotoperíodo natural de 13 h claro: 11 h escuro. As variáveis físico-químicas foram medidas diariamente. Os níveis de oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos com oxímetro digital (Yellow Springs Instruments, modelo-550A, USA). O pH e a salinidade foram aferidos com um medidor de pH (Tecnal model TEC-2, Brasil) e refratômetro manual (Instrutherm, Brasil), respectivamente. O nível máximo

de amônia foi estimado por teste colorimétrico (Alcon, Brasil). As médias ($\pm$ desvio padrão) da temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram 29,0°C ($\pm$ 2,2), 35,0 ($\pm$ 1,3), 8,0 ($\pm$ 0,2) e 6,1 mg. L⁻¹ ($\pm$ 0,2), respectivamente. Não foram detectadas concentrações significativas de amônia.

Tabela 3.1. – Concentração (ind. mL⁻¹ dia⁻¹) de náuplios recém-eclodidos de *Artemia* (Art) e prole de copépodo *Tisbe biminiensis* (Cops) ofertado às pós-larvas (PL) do Camarão *Litopenaeus vannamei* de diferentes idades.

<i>Idade da</i> <i>pós-larva</i>	<i>Controle</i>	<i>Mix</i>	<i>Copépodo</i>
PL 1-3	20 Art.	10 Art. + 10 Cops.	20 Cops.
PL 4-7	40 Art.	20 Art.+ 20 Cops.	40 Cops.
PL 8-10	60 Art.	30 Art.+ 30 Cops.	60 Cops.

Ao final do período de cultivo, todas as pós-larvas foram coletadas das unidades experimentais. A sobrevivência média, o peso seco o comprimento total das pós-larvas foram determinados. A sobrevivência (%) foi determinada para cada repetição através da contagem dos sobreviventes, dividido pelo número total inicialmente estocado (300) e multiplicado por 100. Para determinar o peso seco médio individual (mg pós-larva⁻¹) para cada tratamento, dez pós-larvas foram aleatoriamente removidas de cada repetição, lavadas com água destilada, colocadas em envelopes de papel alumínio, anteriormente pesados em balança de precisão. Os envelopes foram identificados e colocados em estufa a 60°C por 24 h. Comprimento médio individual (mm) das pós-larvas em cada tratamento foi determinado através da remoção aleatória de 10 larvas de cada repetição. Sob um microscópio binocular cada pós-larva foi medida desde a ponta do rostro até a ponta do telson usando uma lente micrométrica.

6.2.4. Teste de estresse

Dez pós-larvas de cada repetição foram submetidas ao teste de estresse salino (Liu et al., 2010). O teste de estresse foi realizado em béqueres de vidro com 500 ml de água do mar (salinidade de 35 g L⁻¹) e suave aeração, em seguida as pós-larvas foram

subitamente transferidas para béqueres de vidro com 500 ml com água doce. A mortalidade foi monitorada em intervalos de 10 minutos durante 1 hora.

6.2.5. Análise estatística

Para avaliar a eficiência das dietas e os resultados do teste de estresse, a Análise de Variância (ANOVA) foi usada comparando as variáveis: sobrevivência, comprimento total e peso seco. O teste de Tukey foi usado para a comparação, em pares, das medias que foram significativamente diferentes ($p < 0.05$) (Zar, 1999).

6.3. Resultados

Na tabela 3.2 pode ser observado um resumo dos resultados. Diferenças significativas foram encontradas na sobrevivência (ANOVA, $F = 9.5783$, $p = 0.0036$). o teste de Tukey mostrou que a sobrevivência no tratamento Controle foi significativamente maior do que nos tratamentos Mix e Copépodo ($p < 0.01$), entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre o tratamento Mix e o tratamento Copépodo ($p = 0.1315$).

Tabela 3.2. – Média ($\pm$ desvio padrão) do peso seco, comprimento total e porcentagem de sobrevivência de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* nos tratamentos Controle, Mix e Copépodo.

	<i>Controle</i>	<i>Mix</i>	<i>Copépodo</i>
<i>Peso seco (mg larva⁻¹)</i>	0.564 ± 0.063^a	0.574 ± 0.011^a	0.539 ± 0.117^a
<i>Comprimento total (mm)</i>	7.1 ± 0.4^b	7.9 ± 0.1^a	6.8 ± 0.2^b
<i>Sobrevivência (PL)</i>	337 ± 50^a	176 ± 10^b	172 ± 16^b
<i>Sobrevivência (%)</i>	100	52	51

Letras iguais representam médias não estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

O comprimento total variou significativamente entre os três tratamentos (ANOVA, $F = 18,4219$ $p = 0,0010$). O teste de Tukey mostrou que o comprimento total no tratamento Mix foi significativamente maior do que no tratamento Copépodo ($p = 0,001$) e tratamento Controle ($p = 0,008$). Não foram encontradas diferenças significativas entre o tratamento Copépodo e Controle ($p = 0,190$).

O peso seco não diferiu entre os tratamentos testados (ANOVA, $F = 0.141$ $p = 0.872$).

A taxa de mortalidade das pós-larvas submetidas ao teste de estresse salino está apresentada na Tabela 3.3. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA, $F = 0.2455$ $p = 0.7874$). Pós-larvas mortas foram encontradas após 20 minutos de exposição súbita de água doce no tratamento controle e demais tratamentos, um novo registro de mortalidade só foi observado após 50 minutos de exposição.

Tabela 3.3. – Mortalidade acumulada das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* após serem subitamente transferidas da água do mar para água doce.

Tratamentos	Tempo após a imersão (minutos)							Mortalidade acumulada
	0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'	
Controle			3			1		4
Mix			2			2		4
Copépodo			3			4		7

6.4. Discussão

A introdução da prole de copépodo *T. biminiensis* na alimentação tradicional das pós-larvas de *L. vannamei* (náuplios de *Artemia*) promoveu um aumento no tamanho e não ocasionou diferenças no peso das pós-larvas nos três tratamentos testados. Esta introdução, no entanto, afetou negativamente a sobrevivência das pós-larvas em quase 50%. A tolerância ao estresse salino não foi afetada pela introdução do copépodo na alimentação destas pós-larvas.

A baixa sobrevivência das pós-larvas nos tratamentos onde houve a introdução prole de copépodo *T. biminiensis* não concordam com os resultados obtidos por outros autores que testaram copépodos como alimento para larvas e pós-larvas de camarões, tanto como alimento único quanto em combinação com náuplios de *Artemia* (D'Abramo et al., 2006; Farhadian et al., 2009).

D'Abramo et al. (2006) testaram o copépodo harpacticóide *Tisbe monozota* (vivos e mortos) como alimento para larvas *Litopenaeus vannamei* (PZ2 ou M1 até PL1). As larvas utilizadas neste experimento possuíam comportamento planctônico e devido aos copépodos apresentarem comportamento bentônico, a baixa sobrevivência das larvas alimentadas com copépodos vivos foi atribuída à falta de acesso das larvas ao alimento. Os resultados obtidos, quando o alimento utilizado foi copépodos mortos, não mostram diferenças nas variáveis peso, comprimento e sobrevivência em relação às que foram alimentadas com náuplios de *Artemia*, mostrando que os copépodos poderiam substituir os náuplios de *Artemia* sem haver perdas para os cultivos.

Farhadian et al. (2009) testaram o efeito do copépodo ciclopóida *Apocyclops dengizicus* como alimento vivo em pós-larvas do camarão *Penaeus monodon*. As pós-larvas alimentadas com *A. dengizicus* em combinação ou não com náuplios de *Artemia* obtiveram uma maior sobrevivência e crescimento em relação as alimentadas apenas com náuplios de *Artemia*, o que provavelmente se deve ao melhor perfil de ácidos graxos da dieta combinada.

Lima et al. (2013) estudaram a composição de ácidos graxos de *T. biminiensis* alimentados com ração (ALCON® basic) e a microalga *Thalassiosira. weissflogii* mais ração e concluíram que ácidos graxos essenciais estavam presentes na composição nutricional deste copépodo. Os ácidos graxos poliinsaturados (ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido docosahexaenóico - DHA) contidos nos copépodos alimentados com ração e microalga foram significativamente mais altos comparados aos presentes nos copépodos alimentados apenas com ração, indicando que a dieta mista seria uma melhor fonte de ácidos graxos altamente insaturados - HUFA para *T. biminiensis*. No entanto, o nível de DHA foi menor que o encontrado em outros copépodos harpacticóides, o que sugere que *T. biminiensis* necessita se alimentar de uma dieta com melhor qualidade ou ser enriquecido com alguns ácidos graxos antes de serem oferecidos às larvas marinhas. Desta forma, neste estudo se utilizou uma ração para alimentar os copépodos com melhor qualidade nutricional, a NRD 5/8 (Inve Aquaculture, Bélgica) e procurou-se enriquecer estes com microalgas antes da oferta às pós-larvas. A qualidade nutricional dos copépodos testados não foi, no entanto, investigada e pode ser parcialmente responsável pela baixa sobrevivência obtida no tratamento alimentado com copépodos em relação ao alimentado náuplios não enriquecidos de *Artemia*, embora não explique porque a sobrevivência foi menor no tratamento com a mistura dos 2 itens alimentares.

A menor sobrevivência das pós-larvas em relação ao tratamento controle, pode estar associada à presença de bactérias patogênicas provindas dos cultivos de copépodos. Lima e Souza-Santos (2007) determinaram a taxa de ingestão de larvas e pós-larvas de *L. vannamei* em função da concentração do copépodo *T. biminiensis*, e observaram que, nas concentrações mais altas, a sobrevivência das larvas diminuiu de 83,3% para 50%. Por outro lado, nos controles utilizando náuplios de *Artemia*, a sobrevivência foi 100%. Os autores atribuíram este resultado a presença de detritos que são encontrados comumente na composição da prole do copépodo *T. biminiensis*. Ribeiro e Souza-Santos (2013) observaram que as rações utilizadas nos cultivos de *T. biminiensis* tendem a deixar mais resíduos na água do cultivo. Aos resíduos de ração são incorporados detritos comumente encontrados em cultivos de copépodos como pelotas fecais e carapaças que, dificilmente, conseguem ser separados e acabam por serem coletados juntamente com a prole produzida que será ofertada para as larvas. De acordo com Drillet et al. (2011), os resíduos da alimentação no cultivo de copépodos pode exercer um efeito negativo sobre a qualidade da água, favorecendo o crescimento descontrolado de bactérias heterotróficas e o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Quando presentes de forma desarmônica nos cultivos, esses microrganismos competem com os copépodos por espaço, alimento e oxigênio e podem exercer um efeito negativo na produção e ainda serem transferidos juntamente com a prole para os cultivos das larvas. Desta forma, não podemos descartar a possibilidade de que junto com a prole fornecida como alimento às pós-larvas de *L. vannamei* tenha havido a introdução de microrganismos patogênicos que possam ter contribuído para a alta mortalidade nestes tratamentos.

Outro fator que pode justificar a alta mortalidade de pós-larvas de *L. vannamei* nos tratamentos onde houve a introdução da prole de *T. biminiensis* é a possibilidade de predação de pós-larvas debilitadas pelos copépodos. Willadino et al. (2012) avaliaram a taxa de ingestão, sobrevivência e crescimento de recém-nascidos de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* cultivados com diferentes alimentos vivos. Os resultados mostram que os cavalos-marinhos alimentados com a prole de *T. biminiensis* em combinação com náuplios de *Artemia* enriquecidos apresentaram melhores resultados de sobrevivência e crescimento. Por outro lado, os cavalos-marinhos alimentados exclusivamente com prole de *T. biminiensis* apresentaram mortalidade superior a 80%. Os autores observaram que os copépodos atacavam os cavalos-marinhos recém-

nascidos. Aqueles juvenis de reprodutores mantidos em cativeiro tiveram uma maior mortalidade nos primeiros dias enquanto aqueles produzidos por reprodutores selvagens resistiam melhor aos ataques dos copépodos. Na natureza, coletivamente, copépodos harpacticóides possuem um hábito alimentar bastante variado, que podemos classificar como oportunista, pois consomem microalgas, bactérias, ciliados, detritos associados a diversas estruturas, muco, entre outros (Hicks e Coull, 1983; Fleeger, 2005). Desta forma, além de restos animais, estes poderiam estar se alimentando do muco presente na superfície do corpo dos juvenis de cavalos-marinhos. No presente trabalho, mesmo que o teste de estresse salino nos indique que as pós-larvas 10 dos três tratamentos testados encontravam-se em semelhantes condições fisiológicas, não podemos descartar a possibilidade que os copépodos tenham atacado no início do experimento, uma vez que estas podem ter sofrido com o estresse do transporte, aclimação e amostragem necessários para a realização do experimento.

Os resultados deste estudo indicam que pós-larvas (PL1 a PL10) de *L. vannamei*, alimentadas com a prole do copépodo *T. biminiensis* se desenvolveram de forma semelhante às alimentadas com náuplios de *Artemia* e, desta forma, na ausência ou restrição de cistos de *Artemia* no mercado a utilização destes copépodos poderia vir a representar uma alternativa para as larviculturas. A alta mortalidade de pós-larvas, registrada nos tratamentos onde houve a introdução do copépodo *T. biminiensis* necessita ser melhor investigada.

6.5. Conclusão

Pós-larvas de *L. vannamei* se desenvolvem bem quando alimentadas com náuplios de *Artemia*, combinados com a prole de *T. biminiensis*. Para se entende melhor a baixa sobrevivência registrada nos tratamentos onde houve a introdução da prole de copépodos, estudos de análise bacteriológica do conteúdo da prole coletada devem ser realizados e a predação pelos copépodos melhor avaliada.

7. Conclusões

O cultivo do copépodo *Tisbe biminiensis* em badejas plásticas no volume de 15 litros com renovação da água do mar e coleta de descendentes realizadas a cada dois dias, aumentou do nível de produção alcançado em estudos anteriores.

Todas as rações testadas no cultivo de *T. biminiensis* se mostraram eficientes em termos de crescimento populacional.

Pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* se desenvolvem bem quando alimentadas com náuplios de *Artemia* combinados com a prole de *T. biminiensis*.

8. Considerações finais

Na tentativa de se obter maiores produções de *T. biminiensis*, fatores como coleta de prole e renovação diária da água de cultivo devem ser testados.

O desenvolvimento de mecanismos que possam eliminar ou reduzir ao máximo a quantidade de restos alimentares e detritos (carapaças e pelotas fecais) coletados junto com a prole de *T. biminiensis*, que servirá de alimento à larvas carnívoras, se faz necessário para evitar que estes possam vir a contaminar a água do cultivo das larvas ou serem consumidos, o que pode resultar em mortalidade larval.

Estudos que avaliem a predação de larvas marinhas por *T. biminiensis* devem ser conduzidos a fim de se entender melhor as altas mortalidades ocorrentes nos testes realizados com esta espécie.

9. Referências

- Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D., Nwogu, N.A. 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:225–246.
- Alvarez-Lajonchere, L., Molejón, O. G. H. (1998). Reproducción y larvicultura de peces marinos. I Congreso Sul-Americano de Aqüicultura. X Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarões. II Feira de Tecnologia e Produtos para Aqüicultura. Recife – PE, Brasil. 105 pp.
- Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC, Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2013. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, Sociais e ambientais da carcinicultura Marinha no Brasil em 2011. Natal. 77 pp.
- Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41, 613-640. v.2 n.4. 5
- Cutts, C.J., 2003. Culture of harpacticoid copepods: potential as live feed for rearing marine fish. *Adv. Mar. Biol.* 44, 295–316.
- D'Abramo. L.R, Perez, E.I., Sangha, R., Puello-Cruz. A., 2006. Successful culture of larvae of *Litopenaeus vannamei* fed a microbound formulated diet exclusively from either stage PZ2 or M1 to PL1. *Aquaculture*. 261, 1356-1362.
- Das. P., Mandal. S.C., Bhagabati. S.K., Akhtar. M.S, Singh. S.K., 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in Aquaculture*. 5, 69-86.
- Drillet, G., Jørgensen, N.O.G., Sørensen, T.F., Ramløv, H., Hansen, B.W., 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as relevant live feed organisms in marine larviculture. *Aquac. Res.* 37, 756–772.
- 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, 155–166.
- Farhadian. O., Yusoff. F. MD., Mohamed. S., Saad. C.R., 2009. Use of Cyclopoid Copepod *Apocyclops dengizicus* as Live Feed for *Penaeus monodon* Postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society* . v. 40, n. 1. 22-32.
- Fava, G., Crotti, E., 1979. Effect of crowding on nauplii production during mating time in *Tisbe clodiensis* and *T. holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida). *Helgol wiss Meeresunters.* 32, 466-475.

- Fleeger, J.W., 2005. The potential to mass-culture Harpacticoid copepods for use as food for larval fish, In: Lee, C.S., Bryen, P.J.O., Marcus, N.H. (Eds.) Copepods in aquaculture. Blackwell, UK. pp. 11-24.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223 pp.
- França, R. C. P., Amaral, I. P. G., Santana, W. M., Souza-Santos, Lília P., Carvalho, L. B., Bezerra, R. S., 2010. Proteases from the Harpacticoid Copepod *Tisbe biminiensis*: Comparative Study with Enzymes from Farmed Aquatic Animals. *Journal of Crustacean Biology*, v. 30, p. 122-128.
- Gaudy, R., Guerin, J.P., 1982. Population dynamics of *Tisbe holothuriae* (Copepoda: Harpacticoida) in exploited mass culture. *Neth. J. Sea Res.* 16, 208-216.
- Guangxing, L., Donghui, X., 2009. Effects of Calanoid Copepod *Schmackeria poplesia* as a Live Food on the Growth, Survival and Fatty Acid Composition of Larvae and Juveniles of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Ocean Univ. China* 8 (4): 359-365.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 26-60.
- Hicks, G. R. F., Coull, B. (1983). The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.* 21: 67-175.
- Jones, D. A.; Yule, A. B.; Holland, D. L. 1997. Larval nutrition. In: D'Abramo, L. R.; Conklin, D. E. & Akiyama, D. M (Eds.). *Crustacean nutrition*. Louisiana: The World Aquaculture Society. 6v. Cap.1. p 353 – 389.
- Kahan, D., Uhlig, G., Schwenzer, D., Horowitz, L. (1981/1982). A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae. *Aquaculture*. 26: 303-310.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Papers 361. Rome.

- Lavens, P., Sorgeloos, P. (1998). Present status and prospects of the use of *Artemia* cysts and biomass in shrimp farming. In: Anais do Aquicultura Brasil '98. Recife, Volume I, p 147-162.
- Lee, K. W., Park, H. G., Lee, S. M., and Kang, H. K., 2006. Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256 (1-4), 346-353.
- Lima, L.C.M., Navarro, D., Souza-Santos, L.P. 2013. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*, *J. Crustac. Biol.* 33, 10. 372-381.
- Lima, L.C.M; Souza-Santos, L. P., 2007. The ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae as a function of *Tisbe biminiensis* copepod concentration. *Aquaculture*, 271 411-416.
- Liu, K.F., Chiu, C. H., Shiu, Y.L., Cheng, W., Liu, C.H. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 837-844.
- Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1999. Instrução Normativa No. 39 de 4 de Novembro de 1999. Diário Oficial da União 213 Seção I: p. 43.
- Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2010. Brasília. 128 pp.
- Núñez, M., Lodeiros, C., Donato, M., Graziani, C., 2002. Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquaculture International* 10: 177-187.
- Olivotto, I., Avella, A.M., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Ruiz Navarro, P., Carnevali, O. 2008b Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92-96.
- Olivotto, I., Tokle, N.E., Nozzi, V., Cossignani, L., Carnevali, O. 2010. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. *Aquaculture* 308, 124-131
- Ribeiro, A.C.B., Souza-Santos, L.P. 2011. Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. *Aquaculture* 321, 280-288.

- Ribeiro, A.C.B., Souza-Santos, L.P. 2013. Mass culture of the harpacticoid copepod *tisbe biminiensis* fed inert diets. Blue Biotechnology Journal. 583-593.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell, J. G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeders. Aquaculture 155: 117 – 127.
- Støttrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155, 231-247.
- Souza-Santos, L.P., Pastor, J.M.O., Ferreira, N.G., Costa, W.M., Araújo-Castro, C.M.V., Santos, P.J.P., 2006. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. Aquac. Res. 37, 1516-1523.
- Sun, B., Fleeger, J.W., 1995. Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. Aquaculture 136, 313-321.
- Volkman-Rocco, B., 1973. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the *Gracilis* group. Arch. Oceanogr. Limnol. 18, 71– 90.
- Willadino, L., Souza-Santos, L. P., Mélo, R. C. S., Brito, A. P., Barros, N. C. S., Araújo-Castro, C. M. V., Galvão, D. B., Gouveia, A., Regis, C. G., Cavalli, R. O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. Aquaculture 360-361, 10-16.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, New Jersey.