UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

NOVAS TECNOLOGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA ECLOSÃO, PRODUÇÃO DE CISTOS E BIOMASSA DE *Dendrocephalus brasiliensis* (PESTA, 1921)

RECIFE

2020

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

NOVAS TECNOLOGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA ECLOSÃO, PRODUÇÃO DE CISTOS E BIOMASSA DE *Dendrocephalus brasiliensis* (PESTA, 1921)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Coorientador (a): Profa. Dra. Fabiana R. A. Câmara
Coorientador: Dr. Thiago Barbosa Cahú

RECIFE
2020

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Leila Laise Souza
Novas tecnologias para a otimização da eclosão, produção de cistos e biomassa de *Dendrocephalus brasilienses* (Pesta, 1921) / Leila Laise Souza Santos. – 2020.

109 f. : il.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra .
Coorientadora: Fabiana R. A. Câmara.
Coorientador: Thiago Barbosa Cahú.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2020.
Inclui referências.

1. Crustáceo. 2. Aquicultura. 3. Animais aquáticos I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador). II. Câmara, Fabiana R. A. (coorientadora). III. Cahú, Thiago Barbosa (coorientador). IV. Título.

595.3 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2020-073

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

NOVAS TECNOLOGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA ECLOSÃO, PRODUÇÃO DE CISTOS E BIOMASSA DE *Dendrocephalus brasiliensis* (PESTA, 1921)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Aprovada em: ___/___/____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra **(Orientador)**

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Bioquímica

_____

Prof. Dr. Dárlio Inácio Alves Teixeira **(Membro Externo)**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (EAJ)

_____

Dr. Janilson Félix da Silva **(Membro Externo)**

Universidade Federal da Bahia

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

_____

Prof. Dra. Juliana Ferreira dos Santos **(Membro Externo)**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Pesca e Aquicultura

_____

Prof. Dra. Karina Ribeiro **(Membro Externo)**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (EAJ)

Dedico este trabalho àqueles que trabalharam para dar-me a base dos meus estudos, me incentivaram a cultivar os melhores frutos. Sem eles eu não estaria aqui e não seria quem sou hoje.

Aos meus pais!

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus por ter dado o dom da vida e ter concedido esta oportunidade e forças para que eu pudesse concluir mais esta etapa de minha vida.

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de ingresso na Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ranilson Bezerra pela oportunidade de ser sua aluna e por todos os ensinamentos do dia-a-dia. Eternamente grata pela confiança em aceitar-me em seu laboratório para a realização de um mestrado e doutorado; e minha Co-orientadora e grande amiga Profa. Dra. Fabiana Rodrigues A. Câmara por estar comigo desde a minha graduação; pela amizade, atenção, paciência e dedicação em me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Um enorme carinho ao meu Co-orientador, Dr. Thiago Cahú por sempre estar disponível a me ensinar; obrigada por aguentar meus aperreios e insistências. Você faz parte de muitos conhecimentos adquiridos durante o mestrado e doutorado. Obrigada por ter sido aquele amigão a me ouvir sempre que precisei e por estar presente nos momentos alegres em que estive em Recife.

A equipe de professores da Aquicultura da Escola Agrícola de Jundiaí pelo apoio e incentivo e em especial aos Professores Dárlio Inácio e Karina Ribeiro pelos conselhos e ajuda para que parte deste trabalho fosse desenvolvido. A professora Viviane por ter sido mãe conselheira nos momentos em que mais precisei. A Camila Fernanda e ao Prof. Dr. Paulo Mário por não exitar em ajudar quando precisei. A todos os funcionários e colegas que estiveram presente nessa etapa, principalmente a Emerson pelas palavras amigas.

A todos os colegas do LABENZ, a Janilson, Cibele (Cymba), Lidiane, Milena, Rafael, Ramiriz (Ramira) e Kivia. Obrigada pelo aconchego e palavras amigas. À Flavinha, todo meu amor e agradecimento por me receber como irmã e me deixar fazer parte de sua família.

Ao Laboratorio de Limnologia e Produção de Alimento Vivo da Escola Agrícola de Jundiaí/UFRN no qual eu tanto pude aprender e ensinar. Cada aluno que convivi e deixei um pouco do que sabia, foi o combustível para eu poder estar aqui; em especial a Juliett e Alê, pois se tornaram mais que colegas de laboratório, irmãs que levarei para sempre. Agradeço imensamente a Marcelo Carvalho pela ajuda final para a realização deste trabalho. Ao Laboratório de Carcinicultura da Prof. Dr. Karina Ribeiro, e seus queridos alunos com quem pude compartilhar alguns meses de experimento e conversas.

Ao Laboratório de Bioquímica, onde fui bem recebida pelo Prof. Dr. Hugo e sua equipe. Ao meu querido Rony, o meu grande agredecimento pela ajuda nas análises. Ao Laboratório de Nutrição Animal da Escola Agrícola de Jundiaí agradeço imensamente pelas análises, e ao Prof. Dr. Emerson, o meu muito obrigada.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LAPLIC/UFRN) coordeando pelo prof. Daniel Lanza, onde realizei os últimos experimentos desta tese. Agradeço imensamente ao prof. e a sua aluna Iasmim pela ajuda concedida.

A Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade.

A meus pais (Antonio Jailson e Maria Aparecida) que me deram a vida, pela confiança depositada e esforço para que eu pudesse estar aqui; obrigada mãezinha pelas conversas todos os dias que estive fora de casa, as ligações diárias que me fortaleciam longe da senhora; cada palavra era um fortalecimento e impulso para poder continuar meu caminhar.

A todos de minha família que estiveram presente em mais uma etapa de minha vida. Em especial aos meus padrinhos Manoel (In memoria) e Sileide que foram o alicerce do início da minha jornada de estudante. Em especial as minhas tias Mônica e Tercia, sem vocês não teria forças para estar longe de casa; a Sérgio, Chiquinho pelas chatices; as minhas primas Talita e Larissa que ao longo desses quatro anos se tornaram minhas irmãs; agradeço às minhas “tianes” de coração, Arielly, Juliana e Taise que fizeram parte dessa grande jornada; ao meu Tio Baltazar que não media esforços nessas andanças de bate e volta a Recife; e a minha princesa do agreste, Clarissa, hoje o grande amor da minha vida.

Ao meu amigo e companheiro, Wagner, que com toda paciência soube estar ao meu lado. Obrigada por todos os momentos juntos.

As minhas amigas de Graduação, Emanuelly e Aline, que apesar da distância nossa amizade continua a fortalecer. Obrigada por cada alegria, a cada vitória minha conquistada. Amo vocês.

Finalmente, a todos que estiveram direta ou indiretamente presente em mais uma etapa de minha vida.

“Levantarei em cima das Pedras, uma escola, como cidade para o futuro”

De Amorim, Enock

RESUMO

O microcrustáceo *Dendrocephalus brasiliensis*, conhecido popularmente como branchoneta, apresenta rápido crescimento, podendo contribuir para inserção na alimentação de organismos aquáticos na forma viva, inerte ou adicionada na formulação de rações, apresentando perfil bioquímico com potencial nutricional para aquicultura. Entretanto, a falta de conhecimento, quando se fala na eficiência de eclosão e sobrevivência, consolidação da cadeia produtiva e sanidade fazem com que o cultivo de branchoneta *D. brasiliensis* não seja praticado dentre os produtores de organismos aquáticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver tecnologia para a produção de biomassa e cistos da branchoneta, fornecendo subsídios científicos e tecnológicos para a aplicação deste microcrustáceo na aquicultura. No Capítulo I, foi avaliado a ação enzimática da quitinase em diferentes concentrações e o seu efeito associado ao hidróxido de cálcio e ácido ascórbico na eclosão de cistos de branchoneta. Os resultados mostraram que o uso de quitinase aumenta a taxa de eclosão, que é intensificada com a adição de hidróxido de cálcio e ácido ascórbico alcançando 96%. No Capítulo II, foi avaliado o desempenho zootécnico e reprodutivo a partir da padronização do grau de melanização em branchoneta com o uso de probiótico. O Experimento consistiu no Tratamento EM, em que as branchoneras foram alimentadas com a espécie de microalga *Scenedesmus quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}), Tratamento EMP com *S. quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}) e probiótico comercial ($0,2g/m^3$) e Tratamento EME com *S. quadricauda* ($1x10^5$ cel.mL^{-1}) e Ração comercial a base de probiótico e Vpak® (aumenta a resistência a doenças) (1,5mL/dia). Os resultados demonstraram a presença de melanose nas branchonetas apenas no Tratamento EM, e ausência nos demais, indicando que o uso de probiótico proporcionou melhor sanidade e desempenho reprodutivo da branchoneta. No Capítulo III, foi avaliado o desempenho zootécnico da branchoneta em diferentes densidades de estocagem, propondo uma metodologia de produção sustentável utilizando um sistema com reuso de água. Os tratamentos consistiram na inoculação de 1g, 2g e 3g de cistos de branchoneta em caixas de 1000 litros com alimentação de microalga *Scenedesmus quadricauda* e uso de probiótico. Ao final de 60 dias foi verificada a sustentabilidade do sistema a partir do reuso de água e diminuição de descarte de matéria orgânica no meio ambiente. Os resultados mostraram que a produção de biomassa e cistos de branchoneta aumenta em função da inoculação de cistos quando inoculados até 3g/1000L chegando a uma produção de 180,15g e 7,83g de biomassa e cistos, respectivamente ao final de 30 dias de cultivo. A qualidade nutricional e a

produtividade obtida neste sistema pode viabilizar o uso desta espécie como alimento vivo durante a engorda de peixes e camarões, além de possibilitar a comercialização de biomassa e cistos.

Palavras-chave: Microcrustáceo. Alimento vivo. Branchoneta. Eficiência de eclosão.

ABSTRACT

The microcrustacean *Dendrocephalus brasiliensis*, popularly known as branchoneta, has potential for aquaculture by presenting rapid growth, contributing to the insertion in aquatic organisms food as in living form, inert or added in artificial feedings, presenting wide nutritional potential for aquaculture. However, the lack of knowledge of the species, when referring to hatching efficiency and survival, productive chain and the sanity of the species, turning branchoneta cultivation not practiced among the producers of aquatic organisms. Thus, this work aimed to develop technology for the production of biomass and branchoneta cysts enabling scientific and technological bases to an application of this microcrustacean in aquaculture. In Chapter I, it was evaluated the effect of chitinase enzymatic action under different concentrations, and its effect associated with calcium hydroxide and ascorbic acid on the outbreak of branchoneta cysts. Results have shown chitinase usage increases hatching, which is intensified with the addition of calcium hydroxide and ascorbic acid reaching 96% hatching rate. In Chapter II the zootechnical performance was evaluated by standardizing the melanization degree in branchoneta supplemented with probiotic. The experiment consisted in treatment EM, which branchoneta were fed with microalgae species *Scenedesmus quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}); treatment EMP consisting of S. *quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}) with commercial probiotic ($0.2g/m^3$); and treatment EME consisting of *S. quadricauda* ($1x10^5$ cel.mL^{-1}) with commercial feeding containing probiotic Vpak® (increases resistance against diseases) (1.5mL/day). The results demonstrated the presence of branchial melanosis only in treatment EM, and the absence in the remaining ones, indicates the use of probiotic provided for branchoneta a better sanity and reproductive performance. In Chapter III, it was evaluated the branchoneta zootechnical performance at different stock densities, proposing a sustainable production methodology, using a system with reuse of water. The treatments consisted of inoculating 1g, 2g and 3g of Branchoneta cysts in 1000 liter boxes supplemented with *Scenedesmus quadricauda* microalgae and probiotic. At the end of 60 days it was verified the sustainability of the system from the water reuse and reduction of disposal organic matter in the environment. The results showed that the biomass production and branchoneta cysts increase as a function of cyst inoculation up to 3g/1000L reaching a total production of 180.15g and 7.83g of biomass and cysts, respectively by the end of 30 days culture. The nutritional quality and productivity obtained from this system may enable the use of this

species as live food during fattening stage for shrimp and fish farming, besides allowing the commercialization of biomass and cysts.

Keywords: Microcrustacean. Live food. Branchoneta. Hatching efficiency.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Página

Figura 1 - Adultos da espécie *Dendrocephalus brasiliensis* durante período reprodutivo com coloração e morfologia diferenciada para (I) fêmea (alaranjada e/ou marrom) apresentando o ovissaco preenchido de cistos e (II) macho (azulado) com presença de apêndice bucal na região da cabeça..... 26

Figura 2 - Fases de vida da branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* nos estágios de (a) ovo, (b) náuplio eclodido após 24h (x10), (c) jovem com quatro dias de vida (4x) e (d) adulto fèmea em fase reprodutiva após 7 dias de vida..... 27

Figura 3 - (a) Branchoneta macho com apêndices frontais e (b) fêmea com ovissaco preenchidos com cistos (x4)..... 28

Figura 4 - Náuplio de artêmia (a) e de branchoneta (b) após 24 horas da eclosão (x10)..... 28

Figura 5 - Processo de coleta, limpeza e secagem de cisto de branchoneta..... 29

Figura 6 - (a) Estrutura da quitina e (b) celulose..... 32

Figura 7- Representação das estruturas de quitina, na qual as setas representam as cadeias poliméricas no sentido terminal não-redutor..... 32

Artigo I 32

Figura 1 - Flowchart of cyst production (1) and hatching using chitinase, ascorbic acid and calcium hydroxide (2), corresponding to the treatment with greater hatching efficiency for *D. brasiliensis*. AA (Ascorbic acid); $Ca(OH)_2$..... 49

Figura 2 - Cyst of *Dendrocephalus brasiliensis* under scanning electron microscopy..... 49

Figura 3 - Number of nauplii hatched in 20 mg of cysts. (A) In [0.008 $U \cdot mL^{-1}$], [0.08 $U \cdot mL^{-1}$], [0.16 $U \cdot mL^{-1}$] of chitinase, where it corresponds to 100% hatching with 1620 nauplii. (B) In [0.16 $U \cdot mL^{-1}$] of chitinase (E), [1.3 $mol \cdot L^{-1}$] calcium hydroxide

(Ca), [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid (AA), [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid +0.16 U·mL^{-1}] chitinase, where it corresponds to 100% hatching with 1771 nauplii. *Equal letters do not show significant differences in treatments by the Student-Newman-Keuls test ($p < .05$)……..... 50

Figura 4 - Action of chitinase and additives on the morphology of larval stage 1 (a) and larval stage 2 (b) for *D. brasiliensis* species. I. Control treatment, II. [0.16 U·mL^{-1}] chitinase (T1), III. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide (T2), IV. [0.1 m mol·L^{-1}] ascorbic acid (T3), V. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0, 1 mol·L^{-1}] ascorbic acid (T4), VI. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid + [0.16 U·mL^{-1}] chitinase (T5). Antenna filaments (FL) first antenna (1A), second antenna (2A), antenna (P), mandible (MD), first maxilla (MX1), second maxilla (MX2), anal opening (AL)…….. 51

Artigo II

Figura 1 - Regiões do aparelho reprodutor do macho (a e b) e da fêmea sem produção de cistos (c), filopódios responsáveis pela natação da branchoneta (d), apêndice reprodutor do macho localizado na cabeça (e) e ausência de alimento no intestino (f) que apresentaram melanização no Tratamento EM durante um mês de cultivo (4x)..... 67

Artigo III

Figura 1 - (a) Desenho esquemático do Sistema de cultivo de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis.* CD: Caixa de decantação; CF: Caixa de filtração; CM: Cultivo de Microalgas; CP: Caixa de produção; TS: Tubulação de saída; TE: Tubulação de entrada; TA: Tubulação de água reserva; CR: Caixa reserva. (b) Layout do Sistema de cultivo de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis*.... 83

Figura 2 - Biomassa (g) e número total de indivíduos nos tratamentos com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*..... 89

Figura 3 - Produção total e número de cistos por grama (g) com inoculações 89

de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*.....
Figura 4 - Crescimento semanal (cm) com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*..... 91
Figura 5 - (a) Taxa de Filtração (G) e (b) ingestão (I) diária com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*..... 93

LISTA DE GRÁFICOS

Artigo I

Página

Gráfico 1 - Number of nauplii hatched in 20 mg of cysts. (A) In [0.008 U·mL−1], [0.08 U·mL−1], [0.16 U·mL-1] of chitinase, where it corresponds to 100% hatching with1620 nauplii. (B) In [0.16 U·mL−1] of chitinase (E), [1.3 mol·L−1] calcium hydroxide (Ca), [0.1 mol·L−1] ascorbic acid (AA), [1.3 mol·L−1] calciumhydroxide + [0.1 mol·L−1] ascorbic acid +0.16 U·mL−1] chitinase, where it corresponds to 100% hatching with 1771 nauplii. *Equal letters do not show significantdifferences in treatments by the Student-Newman-Keuls test (p< .05)…… 50

Artigo III

Gráfico 1 - Biomassa (g) e número total de indivíduos nos tratamentos com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*..... 89

Gráfico 2 - Produção total e número de cistos por grama (g) com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*..... 89

Gráfico 3 - Crescimento semanal (cm) com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*.... 91

Gráfico 4 - a) Taxa de Filtração (G) e (b) ingestão (I) diária com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*..... 93

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Página

Tabela 1 - Valor nutricional de *D. brasiliensis* em relação a outros organismos..... 30

Tabela 2 - Perfil de Aminoácidos encontrados em cultivo de branchoneta *D. brasiliensis* com alta e baixa disponibilidade de alimento..... 30

Tabela 3 - Quitina de cistos, juvenis e adultos de espécies de Anostracas..... 34

Tabela 4 - Patógenos incluídos na lista de notificação obrigatória da OIE (2019) reconhecidos como causadores de doenças infecciosas em crustáceos..... 38

Artigo II

Tabela 1 - Parâmetros físicos e químicos da água em experimento de *D. brasiliensis* cultivadas em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probióticos (EMP) e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME)..... 64

Tabela 2 - Desempenho zootécnico das branchonetas cultivadas durante 30 dias em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probióticos (EMP) e microalgas e ração EZ Larva a base de probiótico e Vpak® (EME)..... 66

Tabela 3 - Avaliação externa da área afetada a partir do 15° dia de cultivo e grau de melanização em branchoneta *D. brasiliensis* cultivadas em aquários com alimentação a base de microalgas (EM)..... 69

Tabela 4 - Contagem de colônias de *Vibrio* spp. em branchoneta *D. brasiliensis* e na água de cultivo em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probiótico (EMP) e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME)..... 70

Tabela 5 - Contagem de *Pesudomonas aeruginosa* em branchoneta *D. brasiliensis* e na água de cultivo dos aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probiótico (EMP)

e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME)..... 70

Artigo III

Tabela 1 - Parâmetros físicos e químicos com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*..... 88

Tabela 2 - Composição centesimal com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
BALs	Bactérias ácido láticas
DNS	Dinidro-salicylic acid
EAJ	Escola Agrícola de Jundiaí
FAO	Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura
GlcNAc	N-acetilglucosamina
IMNV	Infectious myonecrosis vírus
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
LAPLIC	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada
OIE	Organização Internacional de EpizZootias
PstDNV	Penaeus stylirostris densovírus
TCBS	Tiossulfato Citrato Bile Sacarose
TSV	Taura syndrome vírus
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
WSSV	White spot syndrome virus
YHV1	Yellow head virus genotype 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 OBJETIVO 22
1.1.1 Objetivo geral 22
1.1.2 Objetivos específicos 22
2 REVISÃO DA LITERATURA 23
2.1 USO DE ALIMENTO VIVO NA AQUICULTURA 23
2.2 ESPÉCIE EM ESTUDO *DENDROCEPHALUS BRASILIENSIS* (PESTA, 1921) 25
2.3 QUITINA 31
2.4 MÉTODOS DE ECLOSÃO E MECANISMOS DE AÇÃO NO ESTADO DE DORMÊNCIA DE CISTOS DE ANOSTRACA 33
2.5 MODELOS DE PRODUÇÃO EM AQUICULTURA 36
2.6 DOENÇAS EM ANIMAIS AQUÍCOLAS CULTIVADOS 37
2.6.1 DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICO E SEU MECANISMO DE AÇÃO 39
2.6.2 PROBIÓTICO NA AQUICULTURA 41
3 A NEW PROCESS FOR NAUPLIUS PRODUCTION OF THE FRESHWATER FAIRY-SHRIMP *Dendrocephalus brasiliensis* **(PESTA, 1921) AND THE EFFECT OF ENZIMATIC AND CHEMICAL TREATMENT ON HACHING 46**
4 EFEITO DO PROBIÓTICO NO CULTIVO DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis* **..... 55**
5 MODELO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CISTOS DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis* **EM SISTEMA DE REUSO DE ÁGUA 787**
6 CONCLUSÃO 99
REFERÊNCIAS 100

1 INTRODUÇÃO

Aquicultura é reconhecidamente uma atividade que consiste na produção de organismos aquáticos em cativeiro, desde seu estágio inicial (larval), até a fase adulta (fase de engorda), visando fins comerciais. A atividade aquícola cresce em ritmo acelerado quando comparado a qualquer outro setor alimentício, superando o ritmo do crescimento populacional nas últimas cinco décadas. No entanto, alguns setores da aquicultura como, por exemplo, a larvicultura, ainda apresentam alguns entraves que limitam a produção de algumas espécies promissoras para o cultivo. E é na fase de larvicultura, onde ocorre a alimentação inicial das espécies que ocorre o fator determinante para o bom desenvolvimento inicial das larvas (TESSER *et al*., 2005; FAO, 2018)**.**

Dentre os problemas a serem solucionados é possível citar a demanda de alimento vivo ou inerte (biomassa congelada) para aprimorar a produção durante a fase de larvicultura. Atualmente, o microcrustáceo *Artêmia* sp. é o principal alimento vivo de sustentação na larvicultura comercial, devido a valores nutricionais e elevada taxa de eclosão dos náuplios, entretanto este organismo atua como vetor de doenças infecciosas, que comprometem a saúde dos sistemas aquícolas com um todo. A sua produção anual, decorre exclusivamente de atividades extrativistas, que abastace o consumo pelo mercado da aquariofilia, larvicultura de camarão marinho e piscicultura (BOGLINO *et al*., 2012; HAMZA *et al*., 2018; JAMALI *et al*., 2019). Entretanto, são necessários estudos que viabilizem a produção de outras fontes de alimentos que possam contribuir para o avanço da larvicultura de maneira mais rentável, livre de patógenos e de fácil acesso.

O microcrustáceo *Dendrocephalus brasiliensis*, conhecido popularmente como branchoneta, constitui uma espécie de água doce, dióica de fácil identificação, crescendo em torno de um milímetro ao dia após o terceiro dia de vida até atingir um comprimento médio de 15-25mm. São essencialmente filtradores, alimentando-se de microalgas, protozoários, metazoários e matéria orgânica. No ambiente natural, as fêmeas adultas depositam os cistos no substrato durante o período de chuva, os quais somente eclodem após um período de estiagem, quando o substrato for seco e posteriormente hidratado (MEDEIROS, 2003; LOPES *et al*., 2007).

Entretanto, a branchoneta ainda é pouco utilizada como alimento vivo de organismos aquáticos, pois a cadeia produtiva ainda não está consolidada, apesar de existir diversos trabalhos a respeito de sua biologia, tais como comportamento, reprodução, produção de cistos e utilização na dieta de camarões e peixes (CARNEIRO, 2000; LOPES *et al*., 2007).

Outros estudos que têm buscado aumentar a eficiência de eclosão dos náuplios, desenvolvimento e sobrevivência do animal, sendo estes os principais obstáculos ao seu uso em substituição da artêmia (YFLAAR E OLIVEIRA, 2003; LOPES *et al*., 2007; SANTOS *et al*., 2019).

Entretanto, o gargalo da produção em larga escala está relacionado principalmente à reduzida taxa de eclosão e sobrevivência dos náuplios, devido à escassez de estudos e técnicas que propiciem o conhecimento da estrutura do cisto, eclosão e sobrevivência. Diante deste problema, são necessárias pesquisas que proporcionem uma intervenção eficaz na eclosão dos náuplios e determinem técnicas de produção de cisto e biomassa com qualidade nutricional e livre de patógenos capazes de atender a demanda por alimento vivo.

Portanto, o presente estudo testa a utilização de quitinase que hidrolisa a quitina do cisto e reagentes químicos que inativam o estado de latência dos náuplios por meio da liberação de íons e desfosforilação enzimática, como alternativas para melhorar a taxa de eclosão e técnicas para produção de biomassa e cistos de forma sustentável. Desta forma, este trabalho contribui através do desenvolvimento de novas tecnologias para a produção da branchoneta, fornecendo subsídios científicos e tecnológicos a aplicação deste microcrustáceo na aquicultura.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver técnicas que otimizem a produção de biomassa e cistos da branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo de eclosão de cistos de *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta);
- Verificar o efeito de probiótico na otimização da produção de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis*;
- Desenvolver um sistema sustentável de produção de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* em reuso de água;
- Avaliar o desempenho zootécnico e reprodutivo, composição centesimal e perfil protéico no cultivo de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* em sistema de reuso de água e probiótico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso de alimento vivo na Aquicultura

Na larvicultura, algumas espécies de peixes e camarões não aceitam dietas artificiais, e o uso de ração nesta etapa tem proporcionado além de altas taxas de mortalidade, índices de crescimento insatisfatórios, pois as larvas dos organismos aquáticos não possuem sistemas digestório e enzimático completamente desenvolvidos. A alimentação inicial (quantidade, qualidade e frequência alimentar do alimento) tem sido o fator determinante para o bom desenvolvimento das larvas**,** e quando administrada de forma inadequada, pode causar elevadas taxas de mortalidade e baixo crescimento (TESSER *et al*., 2005; YENAS-ROCA *et al*., 2018; EDWARD *et al*., 2019).

Kubitza (2003) descreveu a importância do alimento vivo na fase de larvicultura, e que os organismos aquáticos em ambientes naturais conseguem balancear suas dietas, escolhendo itens que melhor supram suas exigências nutricionais. Porém, quando o animal é confinado em cativeiro, há necessidade de selecionar um alimento que satisfaça estas exigências. Desta forma, o uso de alimentos vivos com alto valor proteico e nutrientes essenciais, característica da maioria dos organismos planctônicos, é de grande importância para assegurar êxito no desenvolvimento do animal durante a fase inicial. De acordo com Lopes *et al.* (1998), para a utilização de alimento vivo em cultivo de larvas de animais aquáticos, existem duas restrições básicas: qual espécie é a mais indicada na alimentação e como realizar o cultivo destas espécies. Assim, pesquisadores vêm realizando experimentos que busquem dietas naturais que supram as exigências nutricionais desde os primeiros dias de vida de peixes e camarões (Lopes *et al.*, 1998).

A demanda de alimento vivo na aquicultura é atendida através do cultivo de microalgas, zooplâncton e microcrustáceos em instalações especiais designadas para este propósito. Atualmente, é utilizado náuplios de Artêmia e rotíferos enriquecidos na larvicultura, com bons resultados de desempenho e sobrevivência das larvas de várias espécies. Porém, um dos grandes problemas da utilização de nauplios de artêmia na larvicultura de água doce é por ser um animal de água salgada, não se tornando por muito tempo atrativo para animais dulcícolas. Desta forma, optando-se pelo uso da biomassa congelada. Também é citada na literatura, a utilização de zooplâncton, como rotíferos, copépodos e cladóceros em complemento ao uso da Artêmia na larvicultura intensiva proporcionando boas taxas de sobrevivência devido ao alto teor lipídico (BLANCO *et al*., 2016; REIS *et al*., 2017). Estes organismos podem ser obtidos de maneira natural através da

fertilização dos viveiros ou produzidos em laboratório. Outra fonte de alimento vivo é o fitoplâncton e vários estudos se concentram nas cloroficeas, que é de extrema importância na sobrevivência e desenvolvimento nas fases iniciais e como complemento da ração na fase de engorda de espécies aquícolas. O fitoplancton também é utilizado na alimentação de zooplânctons e microcrustáceos que são ofertados como alimento vivo na aquicultura. Em laboratórios de larvicultura, o fitoplâncton é cultivado em meio composto por nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, e cada espécie fitoplanctônica requer nutrientes e condições específicos para o crescimento saudável. Já em viveiros de engorda é obtido a partir da fertilização direta na água. Entretanto, em excesso, o fitoplâncton causa depleção de oxigênio dissolvido juntamente com bactérias decompositoras aeróbias podendo prejudicar a respiração da espécie cultivada (SÁ, 2012; YANG *et al*., 2019).

Chlorophyceae é uma das classes de algas verdes mais abundantes e diversificadas em número de espécies planctônicas em águas continentais brasileiras. Há bastante tempo as espécies dos gêneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* e *Chlamydomonas* vêm sendo muito utilizadas na aquicultura para alimentação de animais de água doce, principalmente para microcrustáceos zooplanctônicos (RODRIGUES *et al*., 2010; XUWANG *et al*., 2011). Dentre as microalgas mais utilizadas e fáceis de cultivar, se destacam as espécies do gênero *Chlorella*, a exemplo de *Chlorella vulgaris*, que são excelentes fontes de proteínas, de lipídios e sais minerais como fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio. Outro exemplo de microalga é a do gênero *Scenedesmus*, considerada como bom alimento rico e de alto teor nutritivo, principalmente em lipídios. E mais recentemente, a espécie *Haematococcus pluvialis* vem sendo utilizada como fonte natural de axtaxantina na intensificação da pigmentação de crustáceos, peixes ornamentais e salmonídeos, e suplementação para alimentos vivos na aquicultura (HARDY E CASTRO, 2000; PHUKAN *et al*., 2011; INFANTE *et al*., 2012; LI E LIU, 2019).

Alguns estudos realizados com Anostracas de água doce como *Streptocephalus dichotomus*, *S. mackini*, *S. rubricaudatus*, *S. torvicornis*, *S. sirindhornae* e *Dendrocephalus spartaenovae*, também utilizados como alimento vivo, apresentaram um rápido desenvolvimento quando submetidos a dietas com as microalgas verdes *Chorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Atualmente, poucos trabalhos são descritos a respeito da alimentação ideal pela espécie *Dendrocephalus brasiliensis*, como também outras características que possa a vir otimizar o desempenho zootécnico e a qualidade nutricional da espécie (SRIPUTHORN E SANOAMUANG, 2010; BRITO *et al*., 2011; AMARAL, 2013).

Este microcrustáceo de água doce pode ser mais uma importante fonte alternativa de alimento de larvas de diversas espécies de camarões de água doce e salgada, como também na larvicultura de peixes, pois também possui valores protéicos similares e/ou superiores aos de outros organismos utilizados em grande escala na larvicultura mundial (LOPES *et al*., 1998; YFLAAR E OLIVEIRA, 2003; GAVIÃO *et al*., 2016).

2.2 Espécie em estudo *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

O filo Arthropoda é composto por cinco subfilos, em que se destaca o Crustacea. Neste, a classe Branchiopoda é composta por quatro ordens, sendo uma delas a ordem Anostraca. A fauna dos anostracas é composta por 284 espécies e quatro subespécies organizada em 23 gênero, registrados mundialmente até 31 de dezembro de 2002. O gênero dominante é o *Streptocephalus*, seguido por *Chirocephalus* com 63 e 45 espécies descritas, respectivamente. Em sequência tem-se *Branchinecta* (40 espécies) e *Branchinella* (34 espécies) (BELK E BRTEK, 1995). São confirmadas oito famílias, que são *Artemidae*, *Branchinectidae*, *Branchipodidae*, *Chirocephalidae*, *Parartemiidae*, *Streptocephalidae*, *Tanymastiqiidae* e *Thamnocephalidae*.

Outro gênero da ordem Anostraca é o *Dendrocephalus* e se encontra distribuído entre 14 espécies: *D. cervicornis*, no norte da Argentina (WELTNER, 1980); *D. geayi* (DADAY, 1908), *D. spartaenova* (MARGALEF, 1961), *D. venezuelamus* (PEREIRA, 1984) e *D. affinis* (PEREIRA, 1984), na Venezuela; *D. argentinus*, na Argentina e países limnitrofes (PEREIRA E BELK, 1987); *D. sarmentosus*, na ilha de Santa Cruz, Ilhas Galápagos e Equador (PEREIRA & BELK, 1987); *D. cornutus*, na Libéria, Costa Rica e na América Central (PEREIRA & BELK, 1987); *D. conosuris*, em Venado Tuerto, província de Santa Fé na Argentina (PEREIRA E RUIZ, 1995); *D. goiasensis*, na região Centro-Oeste do estado de Goiás, Brasil (RABET E THIERY 1996); *D. orientalis*, no litoral da Paraiba, Brasil (Rabet & Thiery, 1996)*; D. thieryi* (RABET, 2006); *D. carajaensis*, na Serra dos Carajás, estado do Pará, Brasil (ROGERS *et al*., 2012), e *D. brasiliensis* (PESTA, 1921), em que a ocorrência vai do estado do Piauí, no Brasil até a Argentina. A classificação sistemática da espécie *D. brasiliensis* é descrita a seguir (BOWMAN E ABELE, 1982):

Reino: Animalia
  Filo: Arthropoda
    SubFilo: Crustacea (Brunnich, 1972)
      Classe: Branchiopoda (Latreille, 1817)

Subclasse: Sarsostraca (Tasch, 1969)

Ordem: Anostraca (Sars, 1867)

Família: Thamnocephalidae (Simon, 1886)

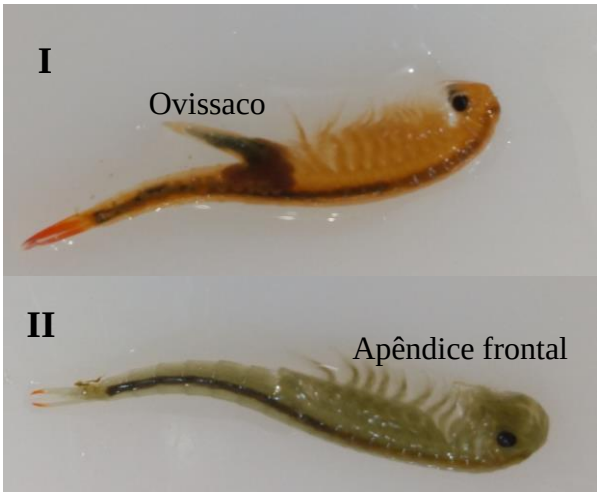
Gênero: *Dendrocephalus* (Latreille, 1817)

Espécie: *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

No nordeste brasileiro, o gênero *Dendrocephalus*, foi registrado por Luiz (1929) no munícipio de Macaiba no estado do Rio Grande do Norte, cuja cor brilhante fez com que o reconhecesse como uma nova espécie, classificada como *Dendrocephalus ornatos*. Linder (1941), logo mais tarde verificou que a espécie descrita por Luiz, era a *D. brasiliensis*, que Pesta havia coletado em 1921 nos estados da Bahia e Piauí.

Popularmente conhecida como branchoneta, camarãozinho ou artêmia de água doce, a espécie *Dendrocephalus brasiliensis* (Fig. 1) é um microcrustáceo dulcícola, apresenta dimorfismo sexual que facilita a diferenciação entre macho e fêmea (Fig. 1) e formam cistos (ovos). Apresenta grande atratividade e atende os requerimentos nutricionais de espécies de peixes carnívoros e ornamentais, e camarões valorizando a sua grande importância como alimento natural (LOPES *et al*., 1998). Possui um ciclo reprodutivo bastante curto, mas não se sabe ao certo o tempo de vida deste organismo. Porém na ausência de predação e enquanto houver disponibilidade de alimento, há relatos de sobrevivência de até quatro meses com produção continua de cistos.

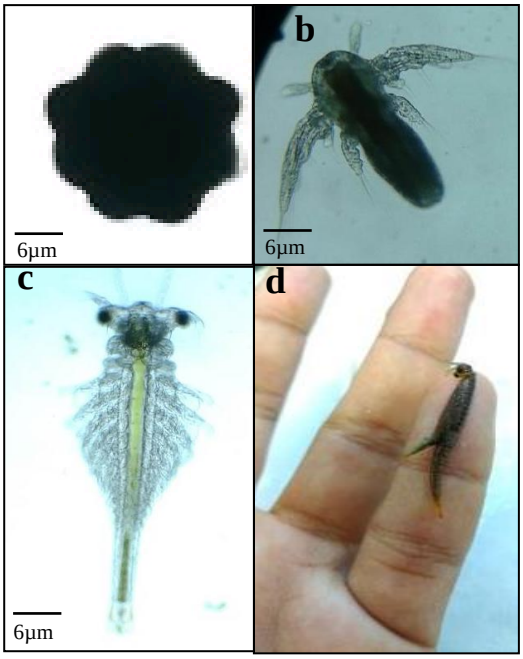
Figura 1: Adultos da espécie *Dendrocephalus brasiliensis* durante período reprodutivo com coloração e morfologia diferenciada para (I) fêmea (alaranjada e/ou marrom) apresentando o ovissaco preenchido de cistos e (II) macho (azulado) com presença de apêndice bucal na região da cabeça.



Fonte: Autor

A branchoneta habita tipicamente lagoas temporárias de água doce, poças, açudes e riachos formados durante a estação chuvosa em todo o Brasil. O ciclo de vida da branchoneta se resume em ovo (Fig. 2a), naúplio (Fig.2b), juvenil (Fig.2c) e adulto (Fig.2d). A espécie se reproduz de forma sexuada, com a liberação de cistos, em condições ideais de temperatura em torno de 28° a 30°C, oxigênio dissolvido na faixa de 5 a 8 mg/L e pH entre 7.5 a 8.0 (dados adquiridos no Laboratório de Produçãode Alimentos Vivos da EAJ/UFRN em experimento realizado) além da abundância de microalgas na sua alimentação. O desenvolvimento da espécie é rápido, crescendo em torno de 1mm após o terceiro dia, chegando a aproximadamente 2,5cm, em ambiente com elevada disponibilidade de alimento. As branchonetas apresentam alta capacidade de filtração, sendo a água de tanques de engorda e berçários de larviculturas, serem as melhores fontes para alimentação massiva para esses organismos, em decorrência da alta carga de microalgas.

Figura 2: Fases de vida da branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* nos estágios de (a) ovo, (b) naúplio eclodido após 24h (x10), (c) jovem com quatro dias de vida (4x) e (d) adulto fèmea em fase reprodutiva após 7 dias de vida.

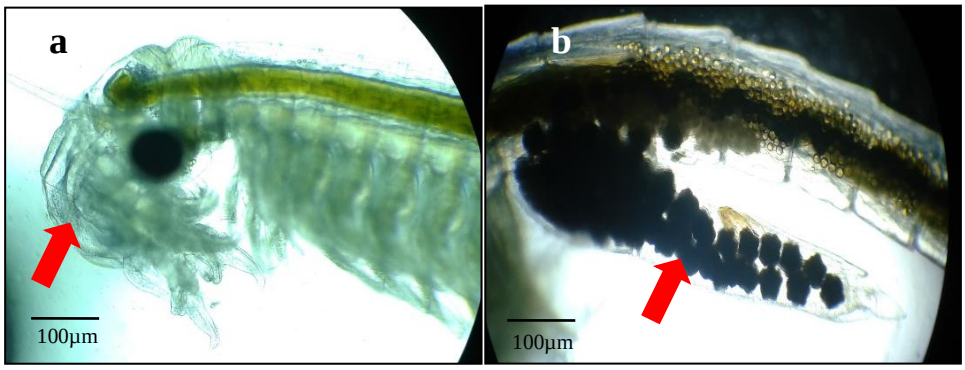


Fonte: Autor

Os machos apresentam coloração variando de transparente a azul, e quando adultos é observado a presença de um apêndice vertical (Fig. 3a) na região da cabeça, responsável por abraçar a fêmea durante o acasalamento. Já as fêmeas apresentam coloração transparentes a marrom quando inicia seu período de reprodução, além da presença de um ovissaco (Fig. 3b),

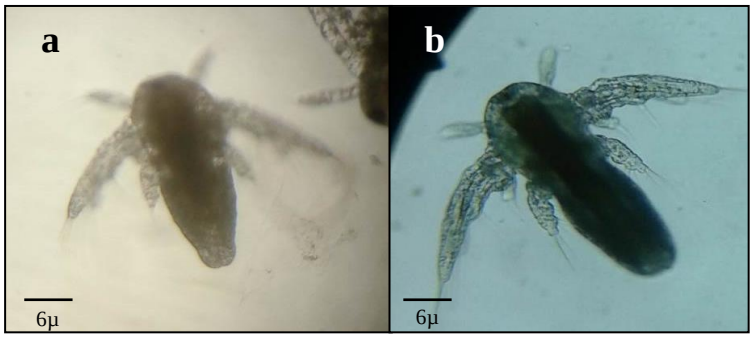
estrutura responsável para armazenar os cistos. Ambos os sexos apresentam a nadadeira caudal alaranjada (Figura 1).

Figura 3: (a) Branchoneta macho com apêndices frontais e (b) fêmea com ovissaco preenchidos com cistos (x4).



Fonte: Autor

Figura 4: Náuplio de artêmia (a) e de branchoneta (b) após 24 horas da eclosão (x10).

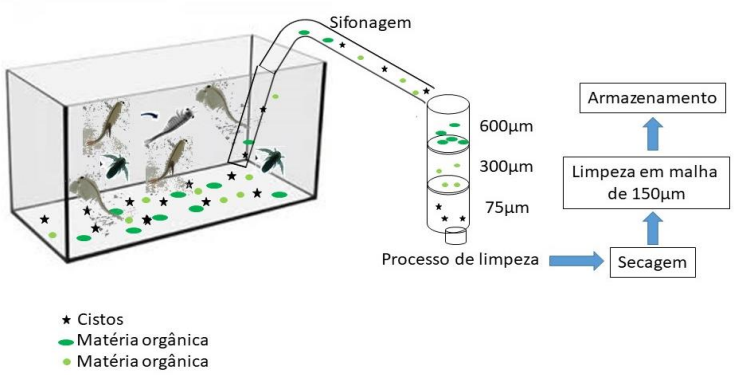


Fonte: Autor

Na natureza, o aparecimento de adultos ocorre com 10 dias após a eclosão dos cistos, onde iniciam o seu período reprodutivo (reprodução sexuada). Durante o período de chuvas ocorre a hidratação dos cistos que eclodem na forma de náuplios, sendo parecidos em formato com náuplios de artêmia (Fig. 4). Os ovos que são liberados pelas fêmeas não eclodem e vão para o fundo, onde precisam desidratar na estação seca para garantir a continuidade da espécie na próxima estação chuvosa (LOPES *et al*., 2008).

Para simular a condição de desenvolvimento que ocorre em ambientes naturais, os sistemas convencionais de produção da branchoneta em cativeiro necessita proporcionar a limpeza para a retirada de matéria orgânica e secagem dos cistos para a desidratação, de modo a possibilitar a eclosão. O processo consiste em passar o cisto coletado em uma sequência de malha de 600, 300 e 75µm, ficando retidos nesta última. Os cistos são submetidos a um processo de limpeza e secagem ao sol (SANTOS *et al*., 2019) (Figura 5).

Figura 5: Processo de Coleta, limpeza e secagem de cisto de branchoneta.



Fonte: Autor

A branchoneta possui hábito gregário, formando aglomerados de indivíduos, nadando em todas as direções, e muitas vezes no sentido vertical de cabeça para baixo, em outras nadam sobre o próprio dorso com os filopódios para cima. São organismos que apresentam telotaxia ventral, ou seja, nadam em direção a luz no ambiente em que se encontram. Por isso, a visualização dos naúplios, após a eclosão é facilitada por esta atração luminosa (LOPES *et al*., 2007). O interesse por este animal e especificamente sua utilização na aquicultura, teve início quando foi testado como alimento vivo conseguindo um incremento no crescimento e sobrevivência para as espécies *Astronotus ocellatus*, *Lophiosilurus alexandre* e *Cichla ocellaris*, quando comparados com outros alimentos convencionais a exemplo de peixes e rações balanceadas (Lopes, 1998).

Lopes *et al*., (2007) realizou experimento testando ração floculada e a branchoneta na alimentação das espécies *Astronotus ocellatus* (apairi) e *Pterophylum scalare* (acará bandeira). Para ambas as espécies a branchoneta apresentou resultados satisfatórios na sobrevivência, comprimento e peso médio.

Assim, o seu alto valor nutricional, atratividade para os organismos aquáticos (peixes e camarões), bons resultados na introdução na forma de alimento vivo e congelado despertou o interesse de estudos de pesquisadores e a possibilidade de realizar a produção deste microcrustáceo. As branchonetas se enquadram na alimentação de organismos aquáticos e se tornam alvos de novas pesquisas como incremento para toda a cadeia da aquicultura continental, piscicultura e carcinicultura, principalmente para a criação de *L. vannamei* em água doce.

Na atualidade, a introdução de *D. brasiliensis* como forma de alimento vivo no cultivo de camarão em água doce está em fase de experimento. A ideia principal do uso desta espécie nos viveiros de engorda de camarão e peixes é produzir cistos que serão depositados no fundo

do viveiro, e secos no solo durante o período de limpeza e intervalo entre os cultivos e hidratados com o enchimento dos viveiros (ciclo continuo), com a eclosão dos naúplios para alimentar as larvas de camarões e branchonetas na fase adulta para serem consumidas durante a fase de engorda; melhorar a condição da água, reduzindo os impactos de água verde sobre o cultivo e sobre o camarão. Assim, a branchoneta pode vir a se tornar um alimento viável e de alto teor proteico para a aquicultura, porém com alguns entraves relacionados a eclosão de cisto e a sua produção, pois ainda é uma atividade em crescimento e não praticada por produtores do setor de Aquicultura.

A branchoneta apresenta teor de proteína bruta de 67,05% (peso seco), perfil aminoácidico e possui altíssima palatibilidade e digestibilidade, capazes de suprir as necessidades protéicas dos organismos aquáticos em qualquer fase de desenvolvimento superando em valores nutricionais de outros animais utilizados na alimentação de organismos aquáticos, com excessão da *Daphinia* sp (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Valor nutricional de *D. brasiliensis* em relação a outros organismos.

Alimentos Vivos	Matéria seca (%)	Proteína bruta (%)	P(%)	Ca (%)	Cinza (%)
D. brasiliensis		67,05	0,54	1,71	14,82
Artemia sp.	11,00	61,6			10,1
Daphnia sp.		70,1	1,46	0,21	
Moina sp.		59,12	1,32	0,16	
Brachionus plicatilis		56,92	1,42		

Fonte: Lopes et al. (1998) (Adaptada)

Tabela 2: Perfil de Aminoácidos encontrados em cultivo de branchoneta *D. brasiliensis* com alta e baixa disponibilidade de alimento.

ALTA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO		**BAIXA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO**	
Molécula	%	Molécula	%
Ácido Glutâmico	16,82	Ácido Glutâmico	20,37
Leucina	12,54	Leucina	12,17
Alanina	10,70	Alanina	9,79
Glicina	8,26	Glicina	9,26
Prolina	6,73	Prolina	7,41

Fenilalanina	6,73	Valina	6,35
Isoleucina	5,81	Fenilalanina	6,08
Ácido Aspartico	4,89	Isoleucina	5,82
Tirosina	4,89	Ácido Aspartico	3,97
Histidina	4,28	Histidina	3,44
Lisina	3,98	Metionina	2,65
Arginina	3,06	Tirosina	2,38
Treonina	2,75	Lisina	2,38
Serina	2,45	Serina	1,85
Valina	1,83	Arginina	1,59
Triptofano	1,53	Treonina	1,59
Cistina 1,22		Triptofano	1,32
Taurina 0,92		Taurina	0,79
Metionina 0,61		Cistina	0,79

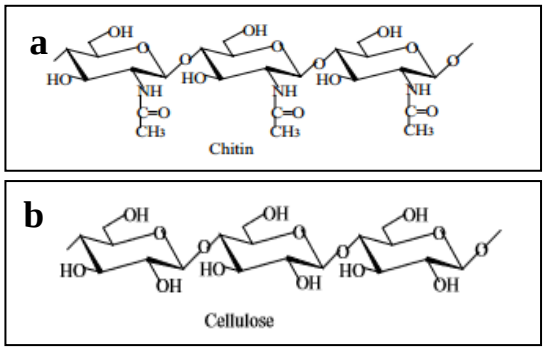
Fonte: Silva, 2016

2.3 Quitina

O termo “quitina” é derivado da palavra grega “khitón”, que significa carapaça ou caixa de revestimento, uma vez que sua função na natureza é de revestimento e proteção de invertebrados (ROSA, 2008). Este polímero, foi isolado por Braconnot em 1881, trinta anos antes do isolamento da celulose, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou severamente suas aplicações industriais até o início dos anos 1970 (CAMPANA-FILHO *et al*., 2007).

A quitina é encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos, cutículas de insetos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Este polímero é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos, pois apresenta microestrutura predominantemente cristalina. Sendo a inviabilidade de dissolução um dos maiores problemas relacionada ao seu uso. Estruturalmente, é semelhante à celulose (Figura 6a e 6b) substituindo-se os grupos OH do Carbono-2 de cada unidade glicosídica da celulose por grupos acetilados (-$NHCOCH_3$). Logo, a quitina é um polissacarídeo linear contendo cadeias de resíduos β-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. A quitina é descrita como o biopolimero mais abundante da natureza depois da celulose (ANTONINO, 2007; HAMED, *et al*. 2016).

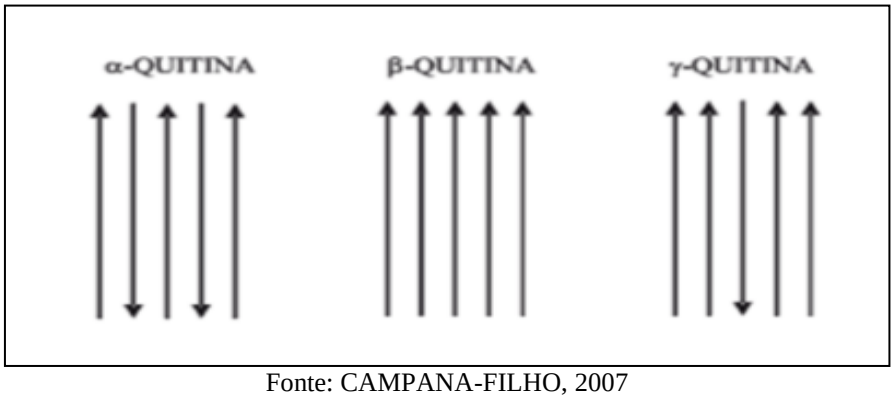
Figura 6: Estrutura da quitina (a) e celulose (b).



Fonte: CAMPANA-FILHO *et al*., 2007

A quitina pode ocorrer em três formas, α, β e γ (Fig. 7), dependendo de sua estrutura. A forma α é a mais abundante, estando presente em estruturas rígidas e resistentes como parede celular de fungos, cutículas de inseto, krill, lagostas, cascas de camarão, carapaça de caranguejos e microcrustáceos. A forma β- e γ-quitina é a mais rara, encontradas em estruturas menos rígidas, porém mais resistentes, apresentando grau de cristalinidade de aproximadamente 72%. É ainda encontrada no esqueleto calcário de alguns animais marinhos (microalga, *Thalassiosira fluviatilis*, por exemplo), ou onde uma certa flexibilidade é necessária, como nos gládios dos cefalópodes. A β é mais reativa que a α, sendo esta uma importante propriedade relacionada às transformações enzimáticas e químicas da quitina (TOLAIMATE *et al*., 2000; RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO *et al*., 2007).

Figura 7: Representação das estruturas de quitina, na qual as setas representam as cadeias poliméricas no sentido terminal não-redutor.



Fonte: CAMPANA-FILHO, 2007

Este polissacarídeo apresenta características interessantes para aplicações biotecnológicas e biomédicas (CAHÚ, *et al.*, 2012). Portanto, pesquisas que envolvam a quitina têm sido desenvolvidas, como a estimativa de produção deste polímero em machos,

fêmeas e cistos em alguns crustáceos da ordem anostraca. Os níveis de quitina variam de fêmea para macho nos estágios de juvenis, sendo nos machos geralmente encontrados os maiores valores (Tabela 3) (CAUCHIE, *et al*., 1997).

Em cistos, os níveis de quitina variam de 5,6-18,0 mg de quitina por g de massa seca nos anostracas. Para as espécies *Thamnocephalus platyurus* e *Artemia salina* o teor de quitina nos cistos é de 11,4 mg e 18,0 ±1,5 respectivamente (Tabela 2). Poucos são os estudos relacionados aos níveis de quitina nos cistos em espécies de crustáceos, entretanto, sabe-se da existência deste polímero na composição do córion, parte externa dos ovos, para a proteção interna (do animal) contra a dessecação em períodos adversos. Este polímero apresenta papel biológico na eclosão dos ovos, que em condições ideais, a maquinaria do cisto libera enzimas para a quebra da quitina, ativando uma cadeia de reações enzimáticas permitindo a eclosão. Portanto, a aceleração da quebra do período de dormência só é possível com o uso químico e enzimático, uma vez que, o processo de eclosão não foi naturalmente ativado (LODISH, *et al*., 2014).

2.4 Métodos de eclosão e mecanismos de ação no estado de dormência de cistos de Anostraca

A grande maioria dos crustáceos da ordem Anostraca, adaptado à vida em ambientes aquáticos temporários, evoluíram para ciclos de vida curtos e fases de latência resistentes à dessecação, sob a forma encapsulada, chamados de cistos ou ovos (BERNICE, 1972). Para estes organismos reiniciarem o ciclo reprodutivo precisa que haja hidratação dos cistos para posterior eclosão. Porém, a eclosão ocorre de forma parcelada, desigual e o período de eclosão dependerá de cada espécie.

De todos os diferentes aspectos da biologia dos anostracas, o estudo de eclosão e desenvolvimento tem atraído a atenção de poucos pesquisadores. Assim, o efeito da secagem e limpeza sobre a eclosão dos ovos/cistos tem sido uma das abordagens pouco investigada (HAY E HAY, 1889; BOND, 1934; DEXTER, 1946). Poucos estudos relatam a importância de metodologias para melhorar a eficiência de eclosão destes cistos, se destacando os trabalhos relatados por Dumont e Casier (1992), Lopes *et al*., (2007), Pereira e Neto (2010) e Santos *et al*., (2019) com o uso de produtos químicos.

Tabela 3: Quitina de cistos, juvenis e adultos de espécies de Anostracas.

Espécies	Sexo ou estádio de desenvolvimento	n	Teor de quitina (mg de quitina/g de massa seca)
Streptocephalus dichotomas	Machos	3	29.2 ± 2.0
	Fêmeas	3	26.8 ± 7.2
	Adultos (machos = fêmeas)	6	28.0 ± 4.9
Streptocephalus proboscdeus	Machos	4	22.7 ± 6.2
	Fêmeas	3	19.3 ± 2.2
	Adultos (machos = fêmeas)	7	21.2 ± 4.9
Streptocephalus simplex	Machos	3	32.7 ± 2.7
	Fêmeas	3	31.2 ± 2.2
	Adultos (machos = fêmeas)	6	32.0 ± 2.4
	Larval	2	13.7 ± 4.4
Streptocephalus torvicornis	Adultos (machos = fêmeas)	2	21.3 ± 0.2
Tramnocephalus platyurus	Machos	4	25.7 ± 2.3
	Fêmeas	5	25.4 ± 1.6
	Adultos (machos = fêmeas)	9	25.6 ± 1.8
	Cistos	1	11.4
Dendrocephalus	Machos	3	14.9 ± 0.6
	Fêmeas	3	15.1 ± 1.1
	Adultos (machos = fêmeas)	6	15.0 ± 0.8
Chirocephalus diaphanus	Machos	4	21.0 ± 1.3
	Fêmeas	5	11.3 ± 1.9
	Adultos (machos = fêmeas)	9	14.5 ± 7.1
Artemia salina	Machos	3	21.0 ± 2.6
	Fêmeas	3	9.2 ± 0.9
	Adultos (machos = fêmeas)	6	15.1 ± 6.7
	Larval	3	5.6 ± 0.7
	Cistos	3	18.0 ± 1.5
Branchipus schaefferi	Machos	3	21.3 ± 4.9
	Fêmeas	3	15.1 ± 2.7
	Adultos (machos = fêmeas)	6	18.2 ± 4.9

Fonte: CAUCHIE, *et al*., 1997

Os ovos de anostracas podem se desenvolver sem secagem e em condições de dissecações a temperaturas extremas do meio (COTTARELLI, 1966). Os cistos de microcrustáceos são do tipo que resistem a dessecação e a temperaturas externas e voltam a

sua forma ativa quando no ambiente as condições são favoráveis para eclosão e desenvolvimento do naúplio. Para a Artêmia, a eclosão dos naúplios depende absolutamente dos fatores físicos e químicos durante o período de incubação, tais como temperatura (25-35°C), salinidade (15-35 ups) e pH (em torno de 8,0) (LAVENS E SORGELOOS, 1996). Condições ideais para produção de naúplios de *D. brasiliensis* ocorre com a coleta, limpeza e secagem dos cistos, estes após secos devem passar por um período de dormência de 10 dias. Assim, os cistos eclodem com 24 horas em condições ideias temperatura (26 – 30 °C) e pH (7 – 8,5) (SANTOS *et al*, 2019).

Os aspectos bioquímicos que envolvem a quebra do estado de dormência de cistos é verificado por Dumont e Casier (1992), na espécie de água doce, *Thamnocephalus platyurus*. Estes autores utilizaram o ácido retinóico como um agente morfogênico e uma fonte de íon cálcio (Cálcio Inofórico) na reativação do cisto. Na qual testou a influência individual, e conjunta, destes reagentes. Pereira e Santos-Neto (2010) verificaram a influência do ácido Ascórbico e íons Cálcio na eclosão de *Dendrocephalus brasiliensis*, e observou que os dois produtos químicos apresentam uma forte influência na aceleração e eficiência de eclosão de cistos na espécie proposta. Alguns trabalhos têm buscado diversas técnicas na eficiência de eclosão dos náuplios de Anostracas e poucos envolvem metodologias que envolvam a atividade enzimática. O mais recente trabalho descrito por Santos *et al*. (2019), mostrou que a eclosão de cistos de *D. brasiliensis* pode ser acelerada pela ação individual da enzima quitinase e associada ao hidróxido de cálcio e ácido ascórbico proporcionou uma eficiência de eclosão de 96% em 24h.

A característica da ação enzimática sobre o organismo é a sua especificidade, em que o conjunto de enzimas envolvidas na degradação da quitina são quitinases. As quitinases são endoglicosil-hidrolases que clivam de forma específica as ligações O-glicosídicas da quitina, entre os carbonos C1 e C4 dos resíduos de β-1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc). Em crustáceos, estas enzimas são associadas a degradação parcial do exoesqueleto durante o desenvolvimento do animal, por um mecanismo que está sobre controle hormonal, já em cistos de microcrustáceos pode atuar na hidrolise da quitina presente nos mesmos, modificando sua estrutura, ou seja, levando a sua eclosão e consequentemente melhorando a eficiência de eclosão (GODONE, 2011; SANTOS *et al*., 2019).

Na eclosão, o hidróxido de cálcio atua na reativação dos cistos devido ao processo de desfosforilação de enzimas latentes, através da via calmodulina (proteína capaz de ligação com íons de cálcio, extremamente conservada ao longo da escala zoológica e essencial para a atuação de diversos hormônios (DUMONT E CASIER, 1992). A calmodulina apresenta

quatro sítios ativos na qual se ligam os íons Ca^{+2}, a ligação do cálcio à calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina quinase II permite que ela faça uma mudança conformacional, ativando-a e permitindo estimular uma variedade de enzimas. Assim, a proteína calmodulina funciona como um ativador da maquinaria celular enzimática que está inativa durante o processo de dormência dos cistos de anostracas. Já o ácido ascórbico funciona como agente morfogênico, na diferenciação dos tecidos atuando no amadurecimento e desenvolvimento dos náuplios. Estes dois produtos são de fácil aquisição no mercado e de preço acessível e que apresentam influencia na aceleração e eficiência de eclosão do naúplio de microcrustáceos (DUMONT E CASIER 1992; PEREIRA E SANTOS-NETO, 2010; LODISH *et al*., 2014).

2.5 Modelos de produção em aquicultura

Aquicultura é a atividade que visa o cultivo de organismos aquáticos, como algas, peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios e répteis, em ambiente aquático controlado ou semicontrolado. E para atender o crescimento acelerado da atividade e os requerimentos nutricionais dos animais, além do uso da ração para alimentação, é necessário o uso de alimento vivo, principalmente nas fases iniciais de cultivo. Entretanto, a produção de alimento vivo, ou cultivo de invertebrados aquáticos sempre foi um fator limitante nas práticas de aquicultura (TAKAHASHI *et al*., 2010).

Dentro da aquicultura há modelos de cultivos que vêm sendo bastante utilizados para elevar a produção de peixes e crustáceos. Porém, a atividade aquícola gera considerável volume de resíduos, sendo necessário uma demanda maior de água para a manutenção e renovação da água de produção. Desta forma, a implementação de sistemas de produção e técnicas de manejo que presam pelo uso racional da água e redução das descargas de efluentes (sistemas de recirculação de água) é importante. A classificação dos modelos de produção pode ser feita de várias maneiras, e dentre elas se tem a classificação baseada no uso da água, classificando os sistemas como aberto, quando não há reutilização da água efluente, semi-fechado quando uma parte da água retorna através de bombeamento, e fechado quando toda a água passa por um processo de tratamento e é reutilizada, necessitando de rigor nos parâmetros de sustentação econômica, social e ambiental (SILVA, 2019).

O desenvolvimento de métodos de cultivo no setor, como reuso de água, proporcionou o maior controle do ambiente aquático, que se traduziu em ganhos de produtividade e qualidade no cultivo de moluscos, algas, peixes e camarões. A atividade passou a apresentar benefícios ambientais relevantes, à medida que começou a ser praticada em pequenas áreas,

reduzindo-se, assim, o número de hectares para produção de uma maior quantidade de proteínas, usando menos água de que outros sistemas e contribuindo para a redução da pressão antrópica do ambiente. Porém, o sistema fechado em que se recircula a mesma água varias vezes pelo cultivo precisa de um controle maior nos parâmetros, tratamento de resíduos e doenças (MARTINS *et al*. 2009; BLIDARIU E GROZEA 2011).

A flora microbiana em sistema de recirculação de água inclui as bactérias benéficas, porém algumas são patógenos obrigatórios ou facultativos e podem causar doenças, pois as cargas bacterianas no sistema de recirculação podem ser altas. Devido à recirculação, as doenças podem se espalhar facilmente de um tanque para outro e a qualidade da água muda com severo impacto a saúde do animal cultivado (MARTINS *et al*., 2009; STEENFELDT 2015). Desta forma, um modelo e técnicas de manejo capaz de promover bom desempenho zootécnico, sanidade animal e sustentabilidade pode ser proposto para o cultivo de qualquer organismo aquático.

Estudos sobre eficiência do sistema de produção e técnicas utilizadas leva a eficientes resultados produtivos de biomassa, taxa de crescimento, produção de cistos (ovos) e valor nutricional, como também o conhecimento da produtividade máxima em que pode se chegar em cultivos de qualquer organismo aquático em diferentes estruturas de produção. Atualmente, as avaliações de produção em sistemas aquícolas se restringem a cultivos de camarões, peixes e rãs, não havendo dados de sistema de produção para animais utilizados como alimento vivo na aquicultura (ARAUJO *et al*., 2018).

2.6 Doenças em animais aquícolas cultivados

A maioria das doenças que causa prejuízo aos produtores de organismos aquáticos é provocada por agentes infecciosos, como resultado da incidência de bactérias, fungos e vírus, sendo as doenças virais e bacterianas apontadas como o principal desafio enfrentado pelos produtores aquicolas em todo o mundo, causando grandes perdas anuais. A Organização Mundial da Saúde Animal, divulgou recentemente a lista de patógenos causadores de doenças infecciosas em crustáceos, com maior ocorrência e número de notificações para os vírus da Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (Penaeus stylirostris densovirus - PstDNV), o vírus causador da Mionecrose Infecciosa (Infectious myonecrosis vírus - IMNV) e o vírus da mancha branca (WSSV) considerado o mais difundido e desastroso em cultivo de camarões pela sua alta morbidade e mortalidade (VALDEZ *et al*., 2014; ROCHA, 2017; OIE, 2019) (Tabela 4).

Além dos camarões, zooplânctons (PORCHAS-CORNEJO *et al*. 2018) algumas poliquetas (vermes aquáticos) (VIJAYAN *et al*., 2005), caranguejos (DING *et al*., 2015; DAS *et al*., 2016), lagostas (MUSTHAQ *et al*., 2006), lagostim (HUANG *et al*., 2015) e copépodes (ZHANG *et al*., 2008) foram identificados como possível fonte de infecção por WSSV na carcinicultura. No microcrustáceo artêmia, já se sabe que pode ser um vetor e hospedeiro horizontal da mancha branca (LI *et al*., 2003; ZHANG *et al*., 2010).

Tabela 4: Patógenos incluídos na lista de notificação obrigatória da OIE (2019) reconhecidos como causadores de doenças infecciosas em crustáceos.

Patógeno	Doença	Etiologia
Aphanomyces astaci	Praga da Lagosta ou Praga do Lagostin	Fúngica
Vibrio parahaemolyticus	Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda	Bacteriana
Hepatobacter penaei	Hepatopancreatite Necrosante	Bacteriana
Penaeus stylirostris densovírus (PstDNV)	Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética	Viral
Infectious myonecrosis virus (IMNV)	Mionecrose Infecciosa	Viral
Macrobrachium rosenbergii nodavirus	Doença da Cauda Branca	Viral
Taura syndrome virus (TSV)	Síndrome da Taura	Viral
White spot syndrome virus (WSSV)	Síndrome da Mancha Branca	Viral
Yellow head virus genotype 1 (YHV1)	Doença da Cabeça Amarela	Viral

A manutenção de altas densidades de populações em áreas limitadas favorece o surgimento e a propagação de doenças responsáveis por grandes mortandades e perdas econômicas significativas. Além disso, a combinação do manuseio inadequado, tanto em sistemas intensivos quanto semi-intensivo, promove uma redução na qualidade da água, o que leva às mudanças ambientais que geram estresse em animais com alterações no sistema imune, o que pode resultar em grandes perdas na produção (ABRAHAM E SASMAL, 2009).

O aumento da atividade aquícola nos corpos de água doce também trouxe como consequência, o risco de outras doenças causadas por bactérias patogênicas, que constituem o grupo de agente etiológico economicamente mais significante depois dos vírus. Algumas

bactérias, como as dos gêneros: *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Mycobacterium* e *Pseudomonas* estão sempre presentes nos tanques, e associadas a presença de fatores estressantes pode desencadear o aparecimento de doenças (KLOSTERHOFF, 2017).

Bactérias oportunistas em geral da ordem das Vibrionáceas, do gênero *Vibri*, e bem como *Aeromonas* e *Pseudomonas*, acometem com frequencia a produção de camarão. Os sinais típicos de vibriose incluem septicemia, hemorragia e úlceras na superfície corporal (EKELEMU *et al*., 2016; HAMZA *et al*., 2018). Em exemplares de *Litopenaeus vannamei* e *L. Stylirostris* analizados por Álvarez *et al*., (2003) foram encontradas regiões melanizadas no exoesqueleto relacionadas com a presença de *vibrios spp* e *Vibrio harveyi* que prejudicou o desenvolvimento dos camarões. Da mesma forma, as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* também são significativas em contribuir para a mortalidade de espécies cultivadas. Resultados relatados por Hamza *et al*., (2018) para *Artemia salina*, mostraram resultados positivos para presença de *Pseudomonas*, quando observados movimentos lentos, descoloração nas superficies corporais, retardo de crescimento e redução da atividade alimentar pela espécie.

Prevenir e controlar doenças bacterianas são, portanto, uma questão importante em ambientes da aquicultura. Desta forma, são utilizados microorganismos biorremediadores e probióticos com a finalidade de matar ou inibir o crescimento de agentes patogênicos e equilibrar o meio, combatendo a mortalidade excessiva dentro da produção. O sucesso deste tipo de atividade também depende da implementação de boas práticas de manejo nos sistemas de produção, como controle da qualidade da água, fornecimento de alimentação equilibrada e de qualidade, garantindo assim a saúde dos animais e consequentemente a prevenção de doenças (GASTALHO, 2014; STALIN E SRINIVASAN, 2016).

2.6.1 Definição de probiótico e seu mecanismo de ação

Em definição geral, probiótico são suplementos de microrganismos vivos capazes de colonizar, estabelecer-se e multiplicar-se no intestino do hospedeiro contribuindo para o equilíbrio da flora intestinal e na prevenção de doenças através da estimulação do sistema imune (NAYAK, 2010; ANDRADE E AZEVEDO, 2018). Na aquicultura, probióticos são usados na alimentação ou diretamente na água de cultivo, e ao serem ingeridos, os microorganismos entram no trato gastrointestinal e são mantidos vivos com o objetivo de fortalecer o sistema de defesa dos animais. Desta forma, ocorre melhor aproveitamento de

nutrientes e um ambiente saudável para os animais (AKHTER *et al*., 2015; DAWOOD *et al*., 2019; ELSABAGH *et al*. 2018).

As pesquisas sobre o uso de probióticos em organismos aquáticos iniciaram-se no final da década de 1980, e o seu uso tem sido uma alternativa na aquicultura em melhorar o desempenho dos animais cultivados com resultados promissores para peixes e larvas de crustáceos. E como produto promotor de crescimento, deve possuir algumas características, tais como, conseguir sobreviver ao trato gastrointestinal, aderir células da parede intestinal, reduzir ou prevenir patógenos, não ser patogénico ao hospedeiro, além de sobreviver a longos períodos de estocagem e armazenagem (VINE *et al.*, 2006; CHANTHARASOPHON *et al*, 2011).

Dentre os microorganismos já testados como probióticos na aquicultura estão, *Lactobacillus sp.*, *Enteroccus sp*, *Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. cereus, Saccharomyces sp.*, e até mesmo algumas especies do gênero *Aeromonas* e outros grupos de bifidobactérias. Parte dessas bactérias são conhecidas como ácido láticas (BALs), como as espécies *Bacillus subtilis e Bacillus cereus,* que são ótimos candidatos a probióticos utilizados em organismos aquáticos. Essas espécies são bactérias que podem ser liofilizadas e, portanto, são capazes de sobreviver a altas temperaturas, como, por exemplo, após o processo de peletização, podendo ser armazenadas em temperatura ambiente sem qualquer efeito deletério, resistindo ao baixo pH chegando intactos ao intestino delgado (CUTTING, 2011; HAI, 2015; SHI *et al*., 2016).

É importante que as bactérias sejam hospedeiro-específicas para que um melhor efeito seja obtido, uma vez que em locais específicos no trato gastrointestinal estão presentes grupos de microrganismos característicos, como bactérias bífidas predominantes no cólon e lactobacilos predominantes no intestino delgado, que modulam a microbiota, através de seus produtos metabólicos. Portanto, os probióticos podem apresentar composições e características distintas, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie de microrganismos e de diferentes cepas (TINH *et al.*, 2008; VILLASEÑOR *et al*., 2012; AKHTER *et al.*, 2015).

Os microrganismos que compõem os probióticos, além de proteger o epitélio, evitam que os patógenos utilizem aminoácidos, minerais e carboidratos para a fermentação de toxinas. Os organismos vivos também atuam na competição pela absorção de ferro, imunoestimulação e disponibilidade de enzimas digestivas, proporcionando maior capacidade de captura e metabolização de nutrientes presentes no lúmen do que os patogênicos que não estão aderidos (FULLER, 1989; ROTH, 2000; BANERJEE E RAY, 2017).

O uso de probióticos vem promovendo grande interesse da indústria da aquicultura. Desta forma, é de fundamental a realização de estudos que avaliem o uso de probióticos na

larvicultura de espécies comerciais de camarões, peixes, e outros animais aquáticos. Avaliando seus benefícios quando adicionados à dieta, que são melhorar a qualidade da água, absorção de nutrientes, sistema imunológico, e as taxas de sobrevivência e desempenho zootécnico, como ganho de peso e crescimento dos animais cultivados (CHITMANAT, 2002; HAY, 2015; BANERJEE E RAY, 2017).

2.6.2 Probiótico na aquicultura

A intensificação da prática aquícola tem proporcionado aumento do estresse animal e ambiental trazendo como consequências o aumento da má qualidade da água (pela grande quantidade de alimento utilizado e produção de fezes de animais) e surtos de doenças que enfraquecem a produção e a sustentabilidade da atividade. Desta forma, o sucesso em cultivo de organismos aquáticos depende da implementação de boas práticas de manejo, principalmente o controle de qualidade da água, realização de quarentena e aquisição de novos lotes geneticamente resistentes a patógenos, fornecimento de alimentação de qualidade e balanceada, para garantir a saúde dos animais e, conseqüente prevenção de doenças (TAVECHIO *et al*., 2009; OLMOS *et al*., 2019).

As espécies de bactérias *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Vibrio* (*Vibrio harveyi, V. parahaemolyticus, V. campbellii*), são mais comuns em cultivos de camarões e de peixes pela intensificação da atividade e aumento das atividades antropogênicas próximo as fazendas. As espécies patogênicas são adaptadas e produzem metabólitos tóxicos inseguros que ameaçam a sanidade dos animais cultivados (ROY *et al*. 2013; LIU *et al*. 2015).

Para controlar as doenças do ambiente aquático foram realizados testes com antibióticos, entretanto sua aplicação resultou em resistência antimicrobiana entre bactérias patogênicas causando muitos problemas e riscos que afetaram negativamente o ambiente e a saúde do hospedeiro. Em alternativa, atualmente o uso de probiótico tem sido utilizado como meio sustentável, seguro e não convencional com capacidade de melhorar o crescimento, eficiência e a saúde de animais cultivados. Desta forma, probióticos tem sido alvo de vários estudos englobando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, microalgas e leveduras. Os microrganismos mais utilizados como probióticos são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bacillus sp*., *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces* e também a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os probióticos são aplicados através de cepas isoladas ou combinadas, vivas ou inativas como aditivo à água, associados (bioflocos) e nas formulações

de dietas de várias espécies de animais aquáticos cultivados, sendo encontrados resultados mais eficazes com o uso de cepas combinadas. (HAY, 2015; DAWOOD E KOSHIO, 2016; DAWOOD *et al*., 2019).

O uso de probióticos abriu uma nova era na produção aquícola industrializada e seu uso ganhou crescente interesse científico e comercial sendo ultilizados em alimentos que promovem a saúde através de suplementos terapêuticos, profiláticos e de crescimento. Dietas suplementadas com probióticos são digeridas e absorvidas de forma mais eficiente devido à capacidade dos probióticos de produzir enzimas digestivas (amilases, proteases e lipases, etc.), metabólitos secundários e fornecerem nutrientes (vitaminas, ácidos graxos aminoácidos), que podem contribuir para o processo de digestão, bem como na assimilação dos componentes da dieta, que resulta em melhoria da saúde geral, condição e desempenho de crescimento de animais aquáticos. Estudos também tem avaliado os efeitos imunomoduladores induzidos por probiótico na aquicultura (HOSEINIFAR *et al*., 2016; DAWOOD *et al*., 2019).

Probióticos tem se tornado efetivas estratégias de controle de doenças em aquicultura. Espécies como tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas suplementadas com probióticos aumentaram sua resistência contra infecções de patógenos bacterianos (*Edwardsiella* sp., *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Photobacterium* sp. e *Vibrio* spp.) (HOSEINIFAR *et al*., 2016; DAWOOD *et al*., 2019). Em estudo realizado por Mello (2013), os resultados demonstraram que o percentual de sobrevivência relativa dos peixes foi maior (89,47%) com a adição de probiótico em relação ao grupo controle (76,61%). E o uso de probiótico ainda proporcionou o aparecimento de bactérias benéficas (*B. cereus* e *B. subtillis*) no trato intestinal como um maior número de unidades formadoras de colônias.

Já em trabalhos com camarões, Li *et al*. (2009) relataram que a suplementação alimentar com *B. megaterium* influenciou o equilíbrio microbiano do intestino, a resposta imune e a resistência a doenças pelo vírus da síndrome da mancha branca. Tan *et al*., (2016) descreve a importância do gênero Streptomyces na formulação de probiótico, pois é uma espécie que exibe atividade antiviral, especificamente contra o vírus da WSSV, além da atividade de antivirulência em *Vibrio* sp e outros patógenos bacterianos, produzindo compostos inibidores e metabólicos envolvidos na formação de biofilme.

Nimrat (2011), descreve que as composições de probióticos afetaram significativamente o crescimento e a sobrevivência de pós larva de *Litopenaeus vannamei* quando foram administrados com bactérias e leveduras ou bactérias, leveduras e *Chaetoceros*.

Isto indicou que as duas combinações de probióticos foram igualmente eficazes no aumento do crescimento e sobrevivência das pós larvas. Outro estudo demonstrou que em camarões da espécie *L. vannamei* foi verificado o aumento da sobrevivência e o ótimo desenvolvimento em larvas, com o uso de *Bacillus sp*, que modulou a microbiota intestinal em camarões. Desta forma, o manejo das combinações adequadas de isolados de *Bacillus* selecionados é uma boa opção para melhorar a saúde, a taxa de desenvolvimento e a sobrevivência no camarão (VILLASEÑOR *et al*., 2012).

No trabalho realizado por Costa *et al*., (2016), utilizando dois tipos de probióticos combinados com varias cepas (P1 contendo *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. pumilus* e *Saccharomyces cerevisiae* e P2 com uma mistura de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Pediococcus acidilactici*) para a espécie *L. vannamei* em sistema de larvicultura comercial, o uso de P2 apresentou melhores resultados do que com o uso do P1 para os estágios de PL 1 e PL 5. Entretando, em PL10, os parâmetros de crescimento (comprimento, peso, taxa de crescimento específico e ganho de peso) avaliados não diferiram entre os dois tratamentos. Desta forma, a escolha a partir da viabilidade e facilidade de obtenção do produto deve ser levado em consideração. Outros estudos com uso de probióticos são descritos para avaliar o crescimento e sobrevivência de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* (VENKAT *et. al*., 2004) e no desenvolvimento inicial de juvenis de robalo-peva (SOUZA *et al*., 2017).

Para os microcrustáceos, como Artêmia, probióticos tem proporcionado aumento da sobrevida em nauplios após desafios com espécies de Vibrios (GIARMA *et al*., 2017; ZOUMPOURTIKOUDI *et al*., 2018). Ferreira (2017) enriqueceu artêmia com probiótico e a utilizou como alimento para juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* e verificou valores positivos no aumento do desempenho zootécnico.

Além de atuar no desenvolvimento e imunidade contra patógenos dos animais aquáticos, as bactérias presentes nos probióticos podem atuar na biorremediação da água, oxidando materia orgánica e CO_2 particulado. Várias pesquisas destacaram que probióticos incluindo bactérias e leveduras, proporcionam um ambiente de cultivo de organismos aquáticos através da redução da proliferação de bactérias patogênicas e fitoplâncton prejudiciais, bem como via biorremediação de resíduos orgânicos na água de criação (BANERJEE E RAY, 2017; ELSABAGHET *et al*., 2018).

Foram relatadas duas tentativas de tratamentos bacterianos para melhorar a qualidade de água e rendimento da produção de *Penaeus monodon*, em que biofiltros flutuantes pré-inoculados com bactérias diminuiu as concentrações de amônia e nitrito na água de cultivo e

aumentou a sobrevivência do camarão (PORUBCAN, 1991a). A espécie *Bacillus* sp., tem se mostrado um importante microorganismo que pode melhorar a qualidade de água, e sua introdução em cultivo de camarão reduziu a demanda química de oxigênio, e aumentou a sobrevivencia da espécie (PORUBCAN,1991b). Queiroz e Boyd (1998) também descreveram que a espécie *Bacillus* sp. proporcionou resultados satisfatórios com o aumento da sobrevivência e produção de bagres, porém não houve interferência nos parâmetros de qualidade da água.

A adição de probióticos com a espécie *Bacillus* em diferentes formas e modo de aplicação às fases de larva e pós-larva de camarão foi associado a níveis significativamente reduzidos de amônia, nitrito e pH. A formação da amônia, ocorre como resultado da decomposição aeróbia e anaeróbia da matéria orgânica oriunda de resto de ração e fezes dos cultivos. Desta forma, o papel das bactérias, é realizar a conversão da amônia e do nitrito em nitrato envolvendo reações de oxidação e síntese com consumo de oxigênio e formação de ácido carbônico, e consequentemente, levando a uma redução do pH (LAKSHMANAN E SOUNDARAPANDIAN, 2008; NIMRAT *et al*., 2011).

Outros estudos mostraram que o uso de probióticos não afetam valores de temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, nitrato e fosfato na água de cultivo. No entanto, o uso de probióticos liofilizados diretamente na água teve uma influência notável nos valores de pH, amônia e nitrito. (NIMRAT *et al*., 2012).

CAPÍTULO I

Artigo 1

Accepted Manuscript

A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching

Leila Laise S. Santos, Thiago B. Cahú, Darlio I.A. Teixera, Karina Ribeiro, Fábio A. Brayner, Luiz Carlos Alves, Ana Paula S. Feitosa, Fabiana R.A. Câmara, Ranilson S. Bezerra

PII: S0044-8486(19)30364-3
DOI: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350
Article Number: 734350
Reference: AQUA 734350

To appear in: *aquaculture*

Received date: 14 February 2019
Revised date: 20 June 2019
Accepted date: 29 July 2019

Please cite this article as: L.L.S. Santos, T.B. Cahú, D.I.A. Teixera, et al., A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching, aquaculture, https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Aquaculture 512 (2019) 734350

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching

Leila Laise S. Santos[a,b], Thiago B. Cahú[a], Darlio I.A. Teixeira[b], Karina Ribeiro[b], Fábio A. Brayner[c], Luiz Carlos Alves[c], Ana Paula S. Feitosa[c], Fabiana R.A. Câmara[b], Ranilson S. Bezerra[a,*]

[a] Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil

[b] Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Escola Agrícola de Jundiaí, RN 160 KM 3, s/n, CEP: 59280-000 Macaíba, RN, Brazil

[c] Instituto Aggeu Magalhães-IAM/Fiocruz e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n- Campus da UFPE, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Microcrustacean
Chitinase
Nauplii
Cyst hatching
Branchoneta

ABSTRACT

The freshwater microcrustacean *Dendrocephalus brasiliensis*, known as branchoneta, has been considered for use as an alternative live feed for commercial aquatic organisms during larval development. However, there are limited studies on techniques to improve nauplii hatching. Thus, the aim of this work was to develop a method for reproduction and cyst recovery, following a new process for nauplius production by the enzymatic action of chitinase and/or chemical treatment. The physical and chemical water parameters and hatching rate were monitored, while morphological changes on nauplii were evaluated after enzyme and chemical treatment by Scanning Electron Microscopy. A hatching protocol was developed for the use of $Ca(OH)_2$, ascorbic acid and enzyme, wherein the most efficient concentration of enzyme for hatching cysts was determined. The concentrations of commercial chitinase tested were 0.008 U·mL^{-1}, 0.08 U·mL^{-1} and 0.16 U·mL^{-1} in 20 mg of cysts, which resulted in the ideal concentration of 0.16 U·mL^{-1} yielding 88% hatching efficiency. Therefore, the concentration of 0.16 U·mL^{-1} was used for the second experimental test, which consisted of a control and five experimental treatments with three replicates. In T1, the cysts were subjected to chitinase, T2 to calcium hydroxide, T3 to ascorbic acid, T4 to calcium hydroxide and ascorbic acid and T5 to calcium hydroxide, ascorbic acid and chitinase. The use of the enzyme showed an increase in the hatching rate of the branchoneta, and the addition of calcium hydroxide and ascorbic acid further increased the hatching efficiency of the nauplii (96%). At the naupliar stage one, the treatment with the use of chitinase, calcium hydroxide and ascorbic acid did not present morphological alterations in nauplii. In larval stage two, nauplii already initiate alterations in the region of the abdomen with T5, with segments developed for the naupliar stage. Therefore, the use of enzyme associated with chemicals promotes an increase in hatching when compared to the traditional hatching process. Moreover, this treatment also promotes a reduction of hatching time, as > 80% of total hatching was observed on the first day. The proposed protocol could be used for the hatching of branchoneta cysts for the use of nauplii offered as food until naupliar stage 2 in fish and shrimp larviculture.

1. Introduction

Fishery production in Brazil has been increasing at an accelerated rate when compared to any other food-producing sector of animal origin (FAO, 2016), and aquaculture is a major contributor to this growth. Some sectors of aquaculture, such as larviculture, still come across obstacles that limit the production of potential farming species. Among the problems to be solved, the demand for live or inert feed (frozen biomass) is pivotal to improve production during the larval phase (Lopes et al., 2011).

Currently, *Artemia* sp. is the main living food for nourishing aquatic species, due to the use of techniques that favor the high hatching rate of nauplii and their nutritional value. This microcrustacean has been successfully used as an initial feed for shrimp and fish larvae (Galloway

* Corresponding author.
E-mail addresses: thiago.cahu@ufpe.br (T.B. Cahú), ransoube@uol.com.br (R.S. Bezerra).

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350
Received 14 February 2019; Received in revised form 20 June 2019; Accepted 29 July 2019
Available online 29 July 2019
0044-8486/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 1999; Britt et al., 2001; Cibele and Andreatta, 2003). Artemia is a saltwater species, and when used as food for freshwater systems, it does not remain active for long, because of the osmotic shock that occurs due to the difference in salinity (Beux and Zaniboni Filho, 2006). Therefore, further studies are necessary to enable the cultivation of other organisms that add value to the advance of freshwater larviculture.

The species *Dendrocephalus brasiliensis*, regionally known as branchoneta, is an Anostraca freshwater microcrustacean of the Family Thamnocephalidae, with very little known about its biology and hatching efficiency. Few studies have focused on branchoneta utilization in the aquaculture industry, as well the behavior, reproduction, cyst production and dietary utilization for carnivorous farmed fish, shrimp and ornamental fish (Lopes et al., 2008). Other studies have attempted to increase the efficiency of nauplii hatching, one of the obstacles to their use in replacement to *Artemia*, but with little success (Lopes et al., 2011; Pereira and Santos-Neto, 2010).

In general, the cysts of the Anostraca, are formed of chitin, and the levels vary from 5.6 to 18.0 mg chitin·g^{-1}. For the species *Thamnocephalus platyurus* and *Artemia salina* the content of chitin in the cysts is 11.4 and 18.0 mg·g^{-1} respectively (Cauchie et al., 1997). Chitin is cleaved by a hydrolytic system classified as *endo*-chitinases, *exo*-chitinases and β-*N*-acetylglucosaminidase. In crustaceans, chitinases are directly related to the regulation of the synthesis and degradation of chitin tegument. Chitinase degrades the chitinous walls present in cysts, thus promoting biological activity by inactivating the latency and possibly stimulating a better hatching of nauplii (Splinder-Barth, 1993).

The considerable advance in fish and shrimp larviculture, being able to become a link in the farming of shrimp and fish, may represent an advance in aquaculture development. Therefore, the objective of this work was to develop a method for reproduction and cyst recovery in culture tanks, following a new process for *D. brasiliensis* nauplius production by the effect of enzymatic action of chitinase and/or chemical treatment on the hatching of the cysts.

2. Material and methods

2.1. Production of branchonetas and cysts

The production of branchonetas and cysts was carried out at the Agricultural School of Jundiaí, Specialized Academic Unit in Agricultural Sciences of the Federal University of Rio Grande do Norte, located in the city of Macaíba/RN.

Initially, 5 g of hatching cysts were maintained in the ratio of 1 g·L^{-1} of water in 2 L PET bottles. After 24 h the hatched nauplii were acclimatized to 500 L (height 0.58 m, base diameter 0.95 m and top diameter 1.22 m) still water tanks with aeration until they reached ovisac formation, and then transferred to 1000 L (height 0.76 m, base diameter 1.16 m and top diameter 1.51 m) tanks adapted for the collection of cysts. The feeding of the branchonetas consisted of phytoplankton with a dominance of unicellular Chlorophyceae (*Scenedesmus* spp., *Chlorella* sp. and *Pseudokirchneriella* sp.). The microalgae were cultured in laboratory conditions in photobioreactors with continuously bubbling air to create a flow. Water exchanges and cleaning of the tanks were performed weekly, along with collection of cysts. The water parameters were constantly monitored and kept at 28 ± 1 °C, pH 8 ± 0.5 and DO 6.5 mg·L^{-1}. Alkalinity and hardness values were 45 and 80 mg·L^{-1}, respectively.

The cysts were collected by the siphoning method, cleaned by water jets in a sequence of sieves of 600, 300 and 75 μm mesh, being retained in the latter. The cysts were submitted to a drying process on a hotplate at 45 °C for 2 weeks and then selected with a mesh of 150 μm to maximize the removal of impurities, and after the dormancy period (10 days) were again submitted to hatching (Fig. 1). The cysts produced were stored in glass vials in a desiccator until the beginning of the experiment.

2.2. Extraction of chitin and evaluation of chitinase activity on branchoneta cysts

2.2.1. Extraction of chitin

The cysts were dried and treated with 1 M HCl and 1 M NaOH to remove minerals and proteins, respectively, during 30 min of shaking (4 times) at room temperature. Depigmentation was performed with 0.1 M sodium hypochlorite solution and the chitin flakes were washed with large amounts of distilled water and oven dried at 45 °C, according to the methodology proposed by Cahú et al., 2012.

2.2.2. Chitinase activity

The enzymatic activity was performed in the Laboratory of Enzymology of the Federal University of Pernambuco. Commercial chitinase from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was used to treat cysts. Chitinase activity was also evaluated using chitin extracted from the shrimp shell (head and cephalothorax) according to the methodology proposed by Cahú et al., 2012. Then, chitin suspension was prepared by solubilizing in 2 M NaOH containing 0,66 M urea, according to Hu et al. (2007). In triplicate, a 125 μL aliquot of hydrated chitin, 125 μL of phosphate buffer (0.02 M and pH 6.0) and 25 μL of chitinase (1 mg·mL^{-1}) were used. The samples were then incubated in a 37 °C water bath, centrifuged and the supernatant was removed for reducing sugars using the dinitro-salicylic acid (DNS) method (Miller, 1959), heated at 100 °C for 15 min and read with a spectrophotometer at 570 nm. A standard curve of *N*-acetyl-glucosamine was carried out in order to quantify the hydrolysis. The branchoneta cysts were also used as a substrate for evaluation of the enzymatic activity of chitinase. Chitin extracted from cysts were hydrated similarly to shrimp chitin, and incubated with chitinase as described to analyze the formation of reducing sugar by the DNS method.

2.3. Experimental design

2.3.1. Experimental design 1: chitinase

Dried cysts were submitted to three treatments in triplicate with different concentrations of chitinase, corresponding to treatments E1, E2 and E3, respectively with 0.008 U·mL^{-1}, 0.08 U·mL^{-1} and 0.16 U·mL^{-1}. The control treatment (C) was characterized by the absence of chitinase and cysts hatched with distilled water in a volume of 200 mL.

In each treatment, 20 mg of cysts in 15 mL were incubated in triplicate in a water bath at 37 °C for 1 h. After determination of enzymatic activity, the volume was filled to 200 mL with distilled water and the hatching rate was verified after 24 h. Determination of the Hatching Efficiency was made with the formula

$$HE(\%) = NH/NC \times 100$$

where:

HE(%) = Hatching Efficiency;
NH = Nauplii hatching in the sample;
NC = Total number of cysts in the sample.

2.3.2. Experimental design 2: calcium hydroxide, ascorbic acid, and Chitinase

From the determination of the best hatching efficiency observed in Test 1, the experimental Test 2 was performed (Fig. 1). The assay consisted of a control and four treatments with three replicates, where in T1 the cyst was submitted to chitinase, T2 to calcium hydroxide, T3 to ascorbic acid, T4 ascorbic acid and calcium hydroxide and T5 in calcium hydroxide, ascorbic acid and chitinase. The control treatment (C) was characterized only by the addition of distilled water. The concentrations of calcium hydroxide (1.3 mol·L^{-1}) and ascorbic acid (AA, 0.11 mol·L^{-1}) were followed according to Dumont et al. (1992), as modified by Pereira and Santos-Neto (2010).

In T1 cysts were previously exposed to chitinase as described in

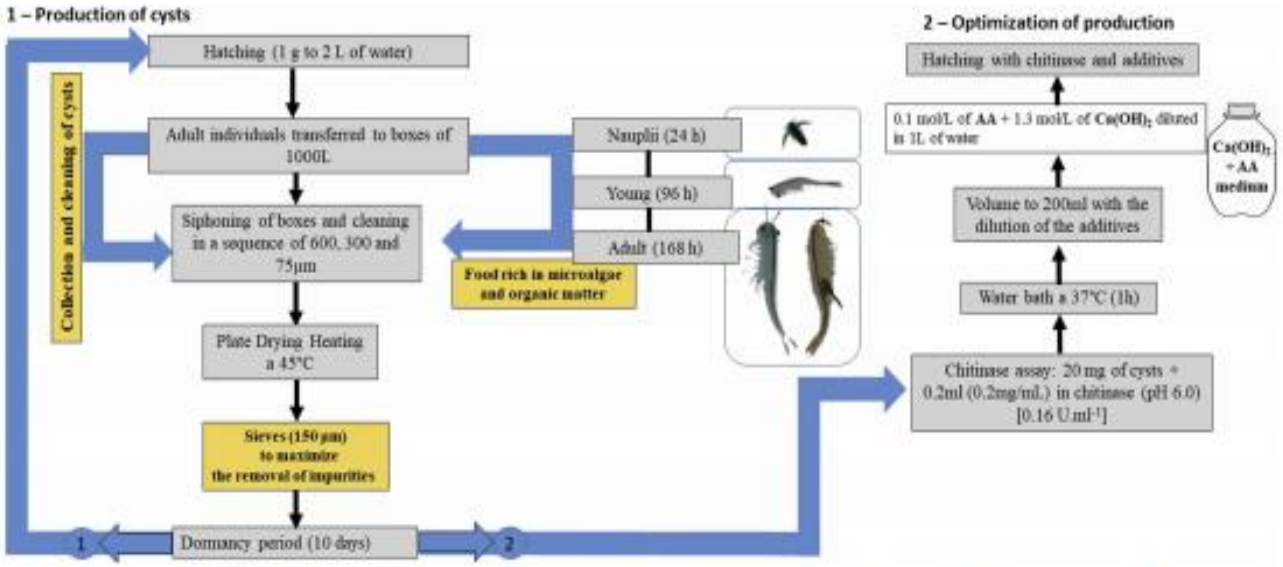


Fig. 1. Flowchart of cyst production (1) and hatching using chitinase, ascorbic acid and calcium hydroxide (2), corresponding to the treatment with greater hatching efficiency for *D. brasiliensis*. AA (Ascorbic acid); $Ca(OH)_2$.

Experiment 1. For Treatments 2 and 3 containing the $Ca(OH)_2$ and AA, respectively, the concentrations were diluted to 1 L of water and 200 mL was withdrawn for each replicate. In T4, the concentrations of $Ca(OH)_2$ and AA together were diluted in distilled water. Finally for T5, the cysts were previously subnitted to chitinase in a water bath at 37 °C for 1 h. The volume was then filled to 200 mL of solution containing Ca $(OH)_2$ and AA (Fig. 1). A 20 mg sample of branchoneta cysts was used for each treatment and hatching efficiency was checked according to the same methodology described before.

2.3.3. Physical and chemical parameters of water

The dissolved oxygen ($mg{\cdot}L^{-1}$) and temperature (°C) were measured by a model MO-900 oximeter (Instrutherm, São Paulo, Brazil). The pH values were obtained by a model mPA-210 pH meter (MS Tecnopon, Piracicaba, Brazil). Alkalinity and hardness of water was determined following the methodology of APHA, 1985.

2.3.4. Morphological analysis

The morphological characterization of 24 h and 48 h old nauplii was performed for all treatments and control by scanning electron microscopy (SEM). The nauplii were sampled and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 12 h at room temperature. Thereafter, samples were washed in the same buffer and post fixed with 1% OsO_4 (*w/v*) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature. Specimens were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%) for 10 min each step. After dehydration, the critical point for the substitution of ethanol with carbon dioxide was obtained, drying the material and mounting it on metallic stubs using double-sided carbon tape. Metallization was then performed by covering the material with a thin layer of gold for visualization and analysis on a JEOL JSM-5600 LV scanning electron microscope. Similarly, the produced cysts (dried) were also analyzed with SEM.

2.4. Statistical analysis

The results were statistically analyzed using SigmaStat software version 3.5. One-Way ANOVA was applied to verify if there was a significant difference between the means of the treatments, with the difference confirmed, the Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test was applied, with a significance level of $p < .05$.

3. Results and discussion

About four days after the hatching of the nauplii, the individuals had already reached the juvenile form. The adult phase was reached after seven days with the definition of reproductive structures, initiating the production and release of cysts of dark color and octagonal shape. A total of 9.5 g of cysts were produced during the two-month culture period, accounting for 91,650 $cysts{\cdot}g^{-1}$ after the cleaning and drying process. Studies have shown that each gram may contain 380,000 cysts (Lopes et al., 2007).

The branchoneta cyst is characterized by a spherical shape whose surface presents uneven border and smoothly rounded regions, in which eight points intersect forming polygonal regions (Fig. 2). When compared to other species of the genus *Dendrocephalus*, it is possible to visualize a greater distance between grooves and depressions. In addition, the depressions are somewhat funnel-shaped due to the reduced circular background (Mura, 1992). Its size is approximately 269 µm when dehydrated and under conditions for hatching.

Several members of Anostraca present chitin in their composition, with significant inter- and intraspecific variation being found in cysts of *Artemia salina* and *Dendrocephalus brasiliensis* (Cauchie et al., 1997). Chitinase exerts an influence on chitin chain breakdown and possibly on the dormancy state of the *D. brasiliensis* cyst. This enzyme has excellent activity from 37 °C and is an important component of the arsenal of plant defense proteins, by catalyzing the hydrolysis of the main

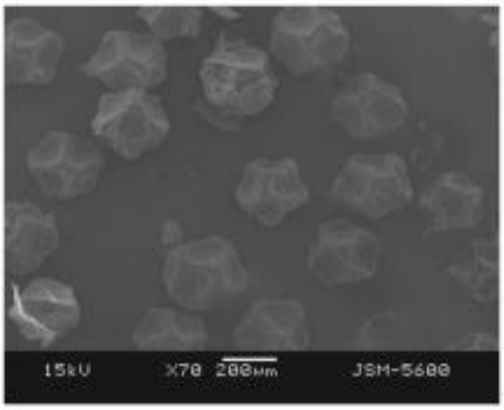


Fig. 2. Cyst of *Dendrocephalus brasiliensis* under scanning electron microscopy.

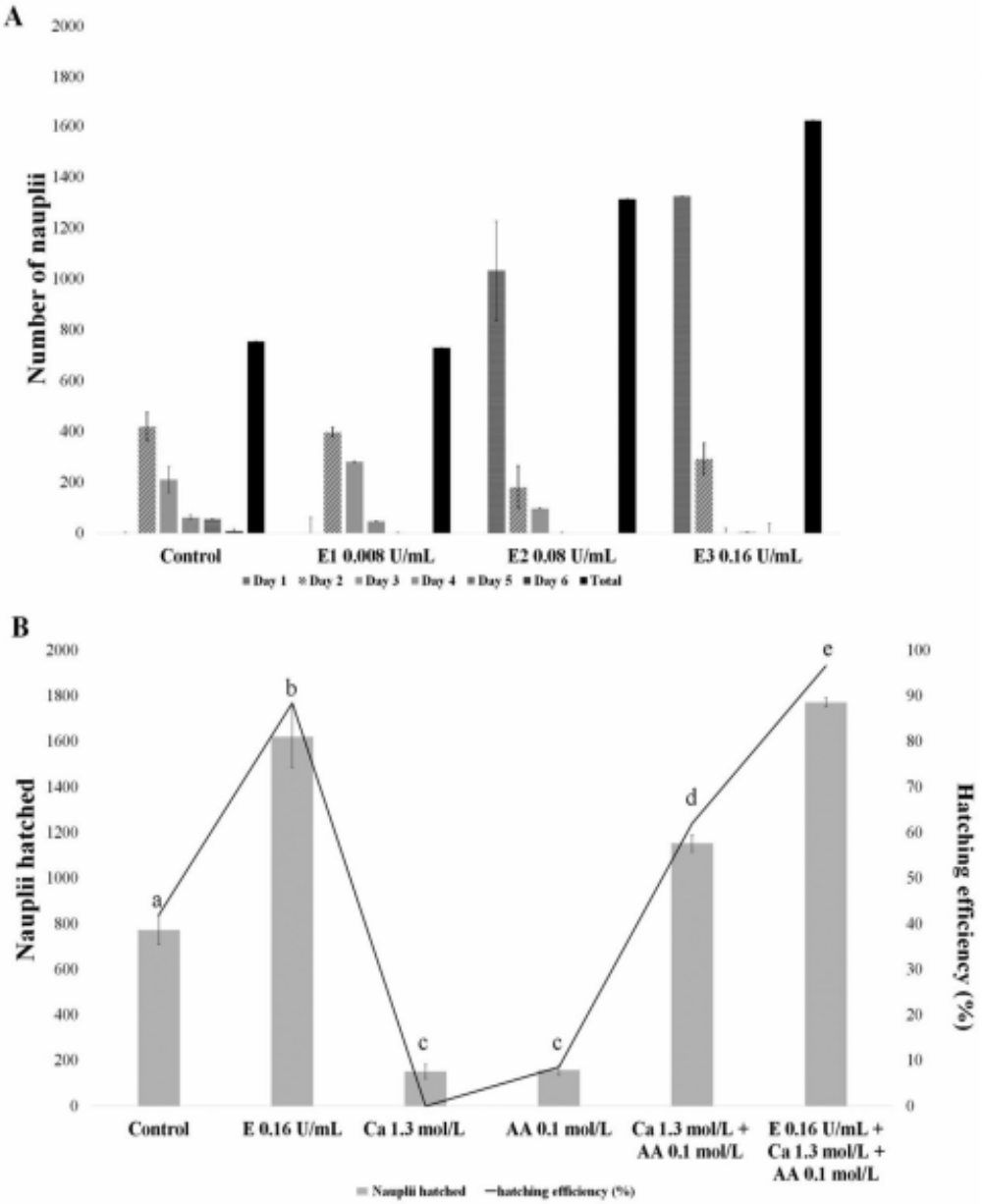


Fig. 3. Number of nauplii hatched in 20 mg of cysts. (A) In [0.008 U·mL^{-1}], [0.08 U·mL^{-1}], [0.16 U·mL^{-1}] of chitinase, where it corresponds to 100% hatching with 1620 nauplii. (B) In [0.16 U·mL^{-1}] of chitinase (E), [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide (Ca), [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid (AA), [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid +0.16 U·mL^{-1}] chitinase, where it corresponds to 100% hatching with 1771 nauplii. *Equal letters do not show significant differences in treatments by the Student-Newman-Keuls test ($p < .05$).

carbohydrates of the cell walls of fungi and cysts of microcrustaceans (Agrios, 1997; Gomes et al., 2010). It was observed that the cyst of *D. brasiliensis* presents chitin in its composition through the activity of the chitinase at a concentration of 1 mg·mL^{-1}, obtaining average activity calculated in 132 mU·mL^{-1}, when compared to chitin of shrimp residues that presented 153 mU·mL^{-1} ($p > .05$). The high chitinase activity in the branchoneta cyst can be related to the high content of 9.4 mg chitin·g^{-1} in the cyst.

The branchoneta nauplii hatched in the first 48 h at a concentration of chitinase of 0.16 U·mL^{-1}, with a hatching average of 1620.66 ± 134.6 nauplii, whereas at 0.08 U·mL^{-1}, there was hatching in 72 h, totaling a mean of 1312.33 ± 44.2 nauplii for 20 mg of cysts. The treatment with lower concentration of chitinase (0.008 U·mL^{-1}) did not present a statistical difference from the control and was not enough to improve the hatching efficiency (Fig. 3A). The higher hatching rate observed in the treatment with the higher concentration of chitinase can be explained by the high content of chitin present in the cyst, showing that the higher the concentration of chitinase, the specific enzyme to break chitin, the higher the hatching rate.

In order to optimize the hatching rates of the nauplii, Dumont et al. (1992) observed biochemical aspects involving the breakdown of cyst dormancy in the freshwater species *Thamnocephalus platyurus*. This author used the individual and combined influence of retinoic acid as a morphogenic agent to stimulate the development of nauplii and calcium ionophore (a stable Ca^{2+} carrier complex) on cyst activation. For the species *D. brasiliensis*, Pereira and Santos-Neto (2010) verified the influence of ascorbic acid and calcium ions on hatching efficiency, who acted on the differentiation the tissue-specific cell (nauplii morphology) and activation of the enzyme, which act as much in the morphology of the nauplii as in the hatching, respectively.

Some factors influence the catalytic activity of enzymes, such as enzyme concentration, substrate concentration, pH and temperature, so

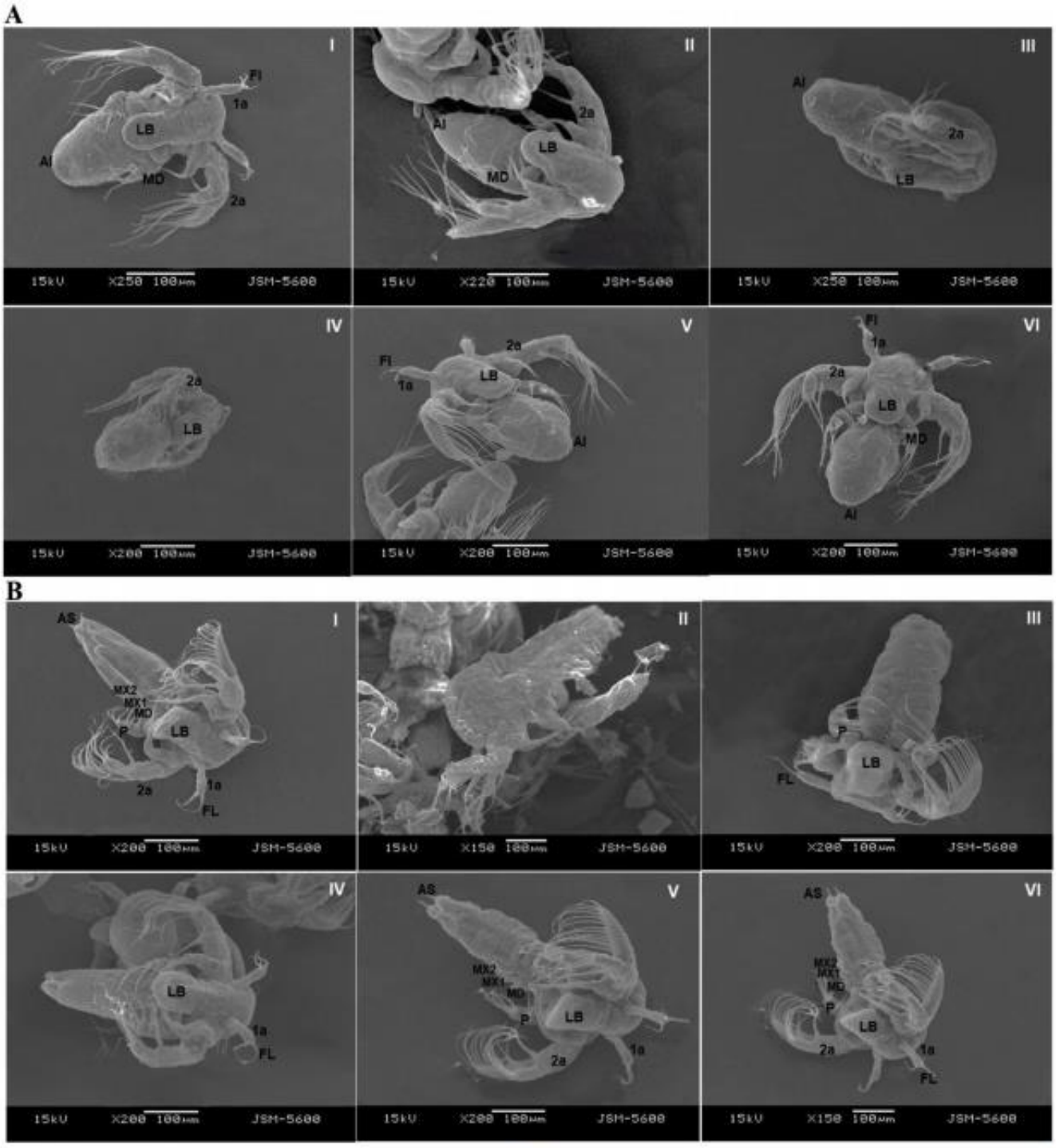


Fig. 4. Action of chitinase and additives on the morphology of larval stage 1 (a) and larval stage 2 (b) for *D. brasiliensis* species. I. Control treatment, II. [0.16 U·mL^{-1}] chitinase (T1), III. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide (T2), IV. [0.1 m mol·L^{-1}] ascorbic acid (T3), V. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0, 1 mol·L^{-1}] ascorbic acid (T4), VI. [1.3 mol·L^{-1}] calcium hydroxide + [0.1 mol·L^{-1}] ascorbic acid + [0.16 U·mL^{-1}] chitinase (T5). Antenna filaments (FL) first antenna (1A), second antenna (2A), antenna (P), mandible (MD), first maxilla (MX1), second maxilla (MX2), anal opening (AL).

that the substrate enzyme relationship influences the reaction rate (Koga et al., 1999). Therefore, the hatching method using chitinase demonstrates that the enzymatic action at higher concentrations promotes hatching in a shorter time. In addition to optimizing hatching time, 0.16 U·mL^{-1} chitinase concentrations provide a hatching rate of 88%. From these results the action of ascorbic acid and calcium hydroxide as hatching catalysts at a concentration of 0.2 mg·mL^{-1} chitinase (Fig. 3B) was verified.

In the microcrustacean cysts, the nauplii before hatching are in the final stage of gastrulation, characterized by the formation of the body and primary differentiation of the structures, however, the development process is inactive (Dumont et al., 1992). Ascorbic acid has the property of activating the embryonic cell differentiation of living organisms, acting as a morphogenic agent to replace the retinoic acid present inside the cyst (Pereira and Santos-Neto, 2010). Other authors mention that retinoic acid does not function as a primary morphogenic agent, but it acts on the differentiation of tissue-specific cells (Wanek et al., 1991; Noji et al., 1991).

Calcium hydroxide provides Ca+2 ions that facilitate the breakdown of the outermost layer of the cyst, called the chorion, reactivating the cysts due to the process of dephosphorylation of latent enzymes, via the calmodulin pathway (Dumont et al., 1992). Calmodulin (an essential protein for the action of several hormones) presents four active sites in which the Ca+2 ions bind. The binding of calcium to calmodulin forms the calcium-calmodulin kinase II complex that allows it to make a conformational change, activating it and allowing the stimulation of a variety of enzymes that act in different processes from the breakup of the cyst to the maturation of the nauplii. Thus, the calmodulin protein initially functions as an activator of the enzymatic cellular machinery that is inactive during the dormancy process of Anostraca cysts (Dumont et al., 1992; Stressmann et al., 2004; Lodish et al., 2014).

In the present study, the combined action of ascorbic acid, calcium hydroxide and chitinase presented higher efficiency results in the hatching of branchoneta nauplii, with an average value of 96.6%, differing statistically from the other treatments. The increase in this hatching rate can be explained by increased chitinase activity and the influence of cations present in calcium hydroxide. The individual and combined use of the products and enzyme provided significant hatching efficiency for some treatments, but with morphological changes in nauplii.

Some authors have stated that the hatching and survival of *Anostraca nauplii* depends on the physical and chemical factors of the water (Lavens and Sorgeloos, 1996; Pereira and Santos-Neto, 2010). Analysis of the physical and chemical parameters of water is necessary because, besides the influence of the enzyme and chemical products that improve the efficiency of hatching of nauplii, good water quality positively affects hatching and survival of nauplii after hatching. Therefore, low (5.0) and high (10.2) pH values in the treatments with ascorbic acid and calcium hydroxide, respectively, may have affected the development of nauplii after hatching due to the acidity and basicity of water after the use of these products. Corroborating the findings of Sipaúba-Tavares and Rocha (2001) and Lopes et al. (2007), the species under study here showed the greatest development with pH around 6.5 and 8.5.

At the naupliar one stage, the individual should have a dorsal medial eye, the first antenna with a distal end, and three sensory spines. The second antenna and the mandible are swimming organs in nauplii. The post-cephalic region is without segmentation and appendages, in which there is an anal opening (Bernice, 1972). The changes in the larval one stage are shown in Fig. 4a where it is possible to observe the loss of the antigen in the treatments with chitinase (T1), calcium hydroxide (T2) and ascorbic acid (T3). For the treatment with only ascorbic acid, the nauplii presented smaller size in relation to the other treatments and the control, and rugosity in the region of the abdomen, which was also verified in the treatment with calcium hydroxide and ascorbic acid (T4). In the control treatment, there is an absence of these mentioned deformations, therefore showing that the use of such products causes morphological deformations from stage one. For the treatment with the use of chitinase, calcium hydroxide and ascorbic acid (T5), nauplii appeared as in the control treatment, showing that the action of the three products together did not affect this naupliar stage. The anal opening is present in all treatments and the labrum region is similar to the control treatment.

The nauplii stage two should present five segments developed in the posterior mandibular region; being the first two, rudiments that will give rise to the upper segments and the other three are rudiments of the thoracic segments. In the anterolateral part of the head, composite eye rudiments are visualized and the first and second antenna are elongated. Caudal spines make their appearance on both sides of the anus (Bernice, 1972). The treatments with calcium hydroxide (T2), ascorbic acid with calcium hydroxide (T4) and hydroxide, ascorbic acid with chitinase (T5) presented a rough abdomen. With the use of chitinase (T1), there was morphological alteration in animal's body, in which its specimens were destroyed or partially destroyed. For all treatments the labrum region is differentiated when compared to the control. The loss of the anal arrow was verified for the treatments with the isolated use of calcium hydroxide (T2) and ascorbic acid (T3). For the treatments T4 and T5 there is the development of the second antenna, mandible, jaws one and two and the thoracic segments. However, for the treatment using only ascorbic acid, alteration was observed in the second antenna (Fig. 4b).

In the treatment in which there was the greatest hatching (T5), the nauplii presented deformities in the abdomen region, but with segments developed for the naupliar stage two. In this way, the branchoneta up to this stage may be offered in the larviculture with the use of the treatment 5. However, further studies should be carried out to evaluate the zootechnical performance of fish and shrimp larvae when fed with branchoneta nauplii after treatment with products that may cause morphological changes in animal development.

4. Conclusion

Branchoneta biomass production is poorly exploited, mainly due to the limited hatching efficiency. The results here presented suggest that cyst hatching can be significantly improved using chitinase action with $Ca(OH)_2$ and ascorbic acid. From the new protocol for reproduction and hatching of branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*) cysts using enzymes and chemical products, it was possible to conclude that chitinase enzymatic activity on the cyst of *D. brasisliensis* increases the hatching rate of nauplii. This activity is intensified with the addition of calcium hydroxide (enzymatic activator) and ascorbic acid (morphogenic agent), which promotes greater efficiency in the hatching of nauplii. However, morphological changes were observed in the nauplii from stage two, when the cyst was submitted to the joint action of the enzyme, calcium hydroxide and ascorbic acid. Thus, branchoneta may represent a potential alternative live-feed for Artemia in fish and shrimp aquaculture.

Acknowledgements

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) through a master's degree scholarship. Thanks are also extended to The Brazilian Innovation Agency (FINEP) for funding the project "RECARCINA" and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their support. Acknowledments to the staff of Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) for the contribution to the SEM analyses.

References

Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology, 4th ed. Academic Press, San Diego, pp. 635p.

APHA, 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edition. American Public Health Association, Washington DC.

Bernice, M.R., 1972. Hatching and postembryonic development of *Streptocephalus Dichotomus* Baird (Crustacea: Anostraca). Hydrobiologia 40 (2), 251–278. https://doi.org/10.1007/BF00016797.

Beux, L.F., Zaniboni Filho, E., 2006. Influência da baixa salinidade na sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp. Bol. Inst. Pesca 32 (1), 73–77. https://www.pesca.sp.gov.br/32_1_73-77.pdf.

Britt, L.L., et al., 2001. Visual pigments in the early life stages of Pacific northwest marine fishes - review. J. Exp. Biol. 204, 2581–2587. http://jeb.biologists.org/content/jexbio/204/14/2581.full.pdf.

Cahú, T.B., et al., 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. Process Biochem. 47, 570–577. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.012.

Cauchie, H.M., et al., 1997. Intra- and interspecific variation in the chitin content of some anostracans. Hydrobiologia 359, 223–228. https://doi.org/10.1023/A:1003110803360.

Cibele, S.P., Andreatta, E.R., 2003. Efeito da oferta de náuplios de Artemia franciscana enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre o desenvolvimento de pós-larvas do camarão marinho Farfantepenaeus paulensis. Rev. Bras. Zootec. 32, 1544–1550. https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000700002.

Dumont, H.J., et al., 1992. Cyst hatching in Anostraca accelerated by retinoic acid, amplified by calcium Ionophore A23187, and inhibited by calcium-channel blockers.

Hydrobiologia 230, 1–7. https://doi.org/10.1007/BF00015110.
FAO. Organização da Nações Unidas para a Agricultura and Alimentação, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. http://www.fao.org/documents/card/en/c/2c8bcf47-2214-4aeb-95b0-62ddef8a982a > , Accessed date: March 2018.
Galloway, T.F., et al., 1999. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (Gadus morhua L.), related to different somatic growth rates. J. Exp. Biol. 202, 2111–2120. http://jeb.biologists.org/content/jexbio/202/15/2111.full.pdf.
Gomes, L.P., et al., 2010. Purification and characterization of grape (Vitis vinifera L. cv Red Globe) chitinases for production of chitosan from shrimp chitin. Quím. Nova 33, 1882–1886. https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900012.
Hu, X., et al., 2007. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. Carbohydr. Polym. 70 (4), 451–458. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.002.
Koga, C., et al., 1999. Characterization of a novel member of the family, XFGF-20, in Xenopus laevis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 756–765. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1039.
Lavens, P.E., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO fisheries technical paper 361, 295. In: File:///F:/FAOManualLiveFood.Pdf.
Lodish, H., et al., 2014. Biologia Celular e Molecular. Ed. Artmed. Sétima ed. pp. 1244.
Lopes, J.P., et al., 2007. Utilização do anelídeo enquitréia *Enchytraeus albidus*, na alimentação do niquim *Lophiosilurus alexandri* durante a alevinagem inicial. Rev. Bras. Engª. Pesca 2, 156–166 file:///F:/UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DO%20ANEL%DEO%20ENQUITR%C3%89IA,%20NA%20ALIMENTA%C3%87%C3%83O%20DE%20ALEVINOS%20DE%20NIQUIM.pdf.
Lopes, J.P., et al., 2008. Influência da inoculação de cistos na produção de biomassa de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921 (CRUSTACEA: ANOSTRACA). Ciênc. Agrotec 32, 598–603. https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200039.
Lopes, J.P., Gurgel, H.C.B., Pontes, C.S., 2011. Comportamento Reprodutivo de *Dendrocephalus brasiliensis*, Pesta 1921 (CRUSTACEA: ANOSTRACA). Rev. Ciência Animal Brasileira 12 (4), 617–625. https://doi.org/10.5216/cab.v12i4.1044.
Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31 (3), 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030.
Mura, G., 1992. Additional remarks on cyst morphometrics in anostracans and its significance. Part II: egg morphology. Crustaceana 63 (3), 225–246. https://doi.org/10.1163/156854092x00389.
Noji, S., et al., 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. Nature 350, 83–86. https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90061-D.
Pereira, D.C., Santos-Neto, M.A., 2010. Influência do Ácido Ascórbico e dos íons Ca^{+2} na ecdosão de cistos do Anostraca Branconeta (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921). Rev. Bras. Eng. Pesca 5, 28–41.
Sipaúba-Tavares, L.H., Rocha, O., 2001. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Ed. RiMa. pp. 106p.
Splinder-Barth, M., 1993. Hormonal regulation of chitin metabolismo in insect cell lines. In: Muzzarelli, R.A.A. (Ed.), Chitin Enzymology, pp. 75–82 European chitin Society.
Stressmann, M., et al., 2004. Calcium interacts with antifreeze proteins and Chitinase from cold-acclimated winter Rye1. Plant Physiol. 135, 364–376. https://doi.org/10.1104/pp.103.038158.
Wanek, N., et al., 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. Nature. 350, 81–83. https://doi.org/10.1038/350081a0.

CAPÍTULO II

Artigo 2

EFEITO DO PROBIOTICO NO CULTIVO DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis*

Leila Laise S. Santos[1,2], Alexandra S. do Nascimento[2], Viviane da Silva Medeiros[2], Thiago B. Cahú[1], Fabiana R. A. Câmara[2], Ranilson de S. Bezerra[1]

Será submetido à Revista *Aquaculture*

EFEITO DO PROBIÓTICO NO CULTIVO DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis*

Leila Laise S. Santos[1,2], Alexandra S. do Nascimento[2], Viviane da Silva Medeiros[2], Thiago B. Cahú[1], Fabiana R. A. Câmara[2], Ranilson de S. Bezerra[1]

[1]*Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP: 50670-901 – Recife (PE), Brasil.*

[2]*Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Escola Agrícola de Jundiaí, RN 160 KM 3, s/n – CEP: 59280-000 – Macaíba (RN), Brasil.*

Autor por correspondência: R. de S. Bezerra; e-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

Os produtores de organismos aquaticos têm se preocupado com o bem-estar e sanidade do alimento vivo. Estes devem ser livres de microorganismos patogênicos que não vetorizem doenças para a espécie cultivada. Um dos problemas que tem dificultado o desenvolvimento saudável da branchoneta e a produção de cistos é o surgimento de enfermidades. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e reprodutivo da branchoneta a partir da padronização do grau de melanização em branchoneta com o uso de probiótico. O Experimento consistiu no Tratamento EM, em que as branchonetas foram alimentadas com a espécie de microalga *Scenedesmus quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}), Tratamento EMP com *S. quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}) e probiótico comercial (0,2g/m^3) e Tratamento EME com *S. quadricauda* ($1x10^5$ cel.mL^{-1}) e Ração comercial a base de probiótico e Vpak® (aumenta a resistência a doenças) (1,5mL/dia). Foram avaliados o desempenho zootécnico e reprodutivo, sanidade dos animais e parêmetros físicos e químicos da água. O uso de probiótico e ração

comercial a base de probiótico e Vpak® possibilitou uma produção de 57.996, 22.079 e 14.960 cistos de branchonetas para os Tratamentos EMP, EME e EM, respectivamente ao final de 30dias, mostrando bons resultados para o desempenho reprodutivo. Esta eficiência reprodutiva foi estabelecida a partir dos resultados da ocorrência de melanização no Tratamento apenas com uso de microalgas (EM), em que foi possível estabelecer um indicador do estado patológico do animal a partir do grau de melanização (Processo de cicatrização em resposta a um dano tecidual, infecções bacterianas e fungícas).

Palavras-chave: Branchoneta, bactéria, sanidade animal, probiótico.

Abstract

Aquatic animal producers have been concerned about the sanity of living food, which should be free of pathogenic microorganisms and not functioning as a disease source for the cultivated species. The emergence of diseases has hampered the development of the branchoneta as live food and the production of cysts. Thus, this work aimed to evaluate the zootechnical and reproductive performance of branchoneta by standardizing the melanization degree in branchoneta supplemented with probiotic. The experiment consisted in treatment EM, which branchoneta were fed with microalgae species *Scenedesmus quadricauda* ($2x10^5$ $cel.mL^{-1}$); treatment EMP consisting of S. *quadricauda* ($2x10^5$ $cel.mL^{-1}$) with commercial probiotic ($0.2g/m^3$); and treatment EME consisting of *S. quadricauda* ($1x10^5$ $cel.mL^{-1}$) with commercial feeding containing probiotic Vpak® (increases resistance against diseases) (1.5mL/day). Zootechnical and reproductive performance, animal health and physical and chemical parameters of water were evaluated. The use of probiotic and EZ Larva feed allowed a production of 57,996; 22,079 and 14,960 branchoneta cysts for the treatments EMP, EME and EM, respectively by the end of 30 days, exhibiting consistent results for reproductive performance. This reproductive efficiency was established from the results melanization

occurrence only on the treatment supplemented with microalgae (EM), which it was possible to establish an indicator of animal pathological state from the melanization degree (healing process response to tissue damage, bacterial and fungal infections).

Keywords: Fairy-shrimp, bacteria, animal health, probiotic.

1. Introdução

A branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis)* é um microcrustáceo filtrador que apresenta ciclo de vida curto podendo chegar a um comprimento médio de 2,5 cm. O período de reprodução se inicia na vida adulta a partir do sétimo dia após a eclosão com fácil distinção entre macho (formação de apêndice vertical na região da cabeça) e fêmea (desenvolvimento do ovissaco) com produção de cistos. Para a aquicultura, a branchoneta é capaz de suprir as necessidades proteicas de qualquer animal aquático cultivado, pois apresenta elevado teor protéico (67,05% PB) mostrando potencial no uso como alimento vivo (Lopes *et. al*., 2007).

Além da qualidade nutricional, os produtores de animais aquáticos têm se preocupado com a sanidade do alimento vivo, que deve ser livre de microorganismos patogênicos e que não funcionem como vertor de doenças. O sistema imunológico de crustáceos aquáticos pode ser desafiado por agentes bacterianos e virais, o que pode ocasionar infecções. E entre as bactérias patogênicas mais frequentes, estão as do gênero *Vibrio* spp. e *Pseudomonas* spp. Já para doenças virais se destacam PstDNV (Penaeus stylirostris densovírus), IMNV (Infectious myonecrosis vírus), TSV (Taura syndrome vírus), YHV1 (Yellow head virus genotype 1) e WSSV (White spot syndrome virus) apontadas como o principal desafio para a carcinicultura (Vazquez *et al*., 2009; Niu *et al*., 2014; OIE, 2019).

O conhecimento da microbiota do intestino e habitat torna possível a aplicação de medidas a fim de evitar um índice elevado de bactérias e vírus patogénicos, eliminando o risco da má qualidade e mortalidade do animal cultivado. Dentre as práticas utilizadas que

minimiza as ações de infecções pelas bactérias patogênicas estão o uso de probióticos com o objetivo de reduzir à ação de patógenos através da exclusão competitiva por populações desejáveis no trato gastrointestinal dos organismos aquáticos melhorando a saúde dos animais. Desta forma, eliminando o desenvolvimento excessivo de víbrios patogênicos, que contribuem para a manifestação do vírus da mancha branca no camarão cultivado (Gatesoupe, 1999; Ribeiro *et al*., 2008; Vazquez *et al*., 2009; Niu *et al*., 2014).

Um dos problemas que tem dificultado o desenvolvimento saudável da branchoneta e a produção de cistos é o surgimento de enfermidades bacterianas, que apresentam entre os sinais clínicos a melanização (Processo de cicatrização em resposta a um dano tecidual, infecções bacterianas e fungícas) em carapaça, seguido de morte, tornando limitado o uso da branchoneta em escala massiva. Além disso, não há estudos que comprovem que a branchoneta atua como vetor de vírus, assim como ocorre com a artêmia em relação ao vírus da mancha branca (Gonçalves, 2004; Ribeiro *et al*., 2008; Parente *et al*., 2011).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e reprodutivo, e a sanidade a partir da padronização do grau de melanização em branchoneta com o uso de probiótico

2. Material e Métodos

2.1 Delineamento Experimental

O Delineamento experimental foi realizado no Laboratório de Produção de Alimentos Vivos da Escola Agrícola de Jundiaí (UFRN) com duração de 30 dias. O experimento consistiu no Tratamento EM, a qual foi ofertada para as branchonetas a microalga *Scenedesmus quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}), Tratamento EMP com *S. quadricauda* ($2x10^5$ cel.mL^{-1}) e probiótico comercial ($0,2g/m^3$) e Tratamento EME com a oferta de *S. quadricauda* ($1x10^5$ cel.mL^{-1}) e Ração comercial a base de probiótico e Vpak® (aumenta a resistência a doenças) (1,5mL/dia). A ração comercial foi diluída em tubo de ensaio de 10mL

na proporção de 1:9 (ração: água), e as concentrações algais ofertadas foram preestabelecidas em experimento piloto. A cepa da microalga *Scenedesmus quadricauda* D115 foi isolada e cedida pelo Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB) e o cultivo foi mantido em meio Chu (Chu, 1942) no Laboratório de Produção de Alimento Vivo da EAJ.

Para cada Tratamento três réplicas, totalizando 9 aquários com 15 L de volume útil de água contendo 50 náuplios. Os náuplios eclodidos após 24 horas foram distribuídos nos aquários e a partir do terceiro dia alimentados conforme os Tratamentos. A água dos aquários foi filtrada em malha de 20 µm e diariamente 20% do volume foi retirado e realizada imediata reposição com oferta de alimento, sempre verificando a compatibilidade de pH e temperatura entre a água de reposição e a do aquário.

2.2 Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da água, pH, alcalinidade ($mgCaCO_3\ L^{-1}$), dureza ($mgCaCO_3\ L^{-1}$) e amônia tóxica ($mg\ L^{-1}$) foram mensurados em dias alternados pelo o horário das 9h da manhã. O valor de pH foi obtido a partir do pHmetro de bancada, modelo mPA-210, a alcalinidade e dureza da água seguindo a metodologia descrita em Apha (1985) e amônia tóxica a partir da metodologia de Golterman et al., (1978) para amônia total em função do pH e temperatura. Já o oxigênio dissolvido ($mg\ L^{-1}$) e temperatura (°C) foram mensurados diariamente com o auxílio do oxímetro, modelo MO-900.

2.3 Desempenho Zootécnico

Foram determinados o crescimento, biomassa final e sobrevivência das branchonetas em cada réplica dos tratamentos. Para o crescimento (cm) e peso semanal (g) foram mensurados aleatoriamente 25 indivíduos de cada réplica com auxílio de paquímetro digital

fibra de carbono, modelo NOVE54. Os organismos foram secos com auxílio de papel toalha para a retirada do excesso de umidade e pesados em balança analítica (Shimadzu AY 220) para a obtenção do peso individual por semana e da biomassa final. O número total de indivíduos foi contabilizado para cálculo de sobrevivência.

2.4 Desempenho Reprodutivo e Produção de Cistos

A partir da presença de cistos no ovissaco, a água foi retirada diariamente para a reposição de alimento e armazenada para a contabilização dos cistos e ao final do experimento submetida a uma malha de 75 µm para a retenção dos mesmos. A limpeza foi realizada com jatos d'água em uma sequência de malhas de 600, 300 e 75µm, ficando retidos nesta última. Os cistos foram submetidos a um processo de secagem ao sol em recipientes plásticos por 15 dias e em seguida selecionados com uso de malha de 150µm para maximizar a retirada de impurezas (Santos *et al*., 2019).

O desempenho reprodutivo foi avaliado a partir da quantificação de cistos totais e número de cistos por fêmeas ao término do experimento para cada unidade experimental. O peso total de cistos (g) foi verificado em balança analítica e para a contagem foi utilizada uma média de três amostras de 0,02 gramas cistos e o resultado foi extrapolado para o peso total da amostra. Já para a contabilização de cistos por fêmea, foram retirados 6 exemplares de cada Tratamento e com o auxilio de Lupa, o ovissavo foi dessecado, contabilizado o número de cistos e realizada média amostral. Os cistos produzidos foram armazenados em frascos de vidro em dessecador para posteriores eclosões.

2.5 Avaliação dos níveis de melanização

Para cada tratamento, todas as branchonetas foram avaliadas todos os dias, e as que apresentaram pontos de melanização durante e ao final do experimento foram retiradas e

examinadas imediatamente seguindo uma escala visual e devolvidas aos aquários. Para avaliar o estágio de melanização foi desenvolvido uma escala de 0 a 3 (Adaptado de Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel, 2014). Em que:

0 = ausente;

1 = leve (uma área do indivíduo afetada);

2 = moderada (duas a três áreas do indivíduo afetada);

3 = grave (Intestino vazio e melanização no aparelho reprodutor com consequente ausência de produção de cistos).

2.6 Análise bacteriológica e Coloração de GRAM

Ao final do experimento, as branchonetas e a água de cultivo de cada tratamento foram utilizadas para a realização da análise bacteriológica. As branchonetas foram maceradas na proporção de 1g de amostra para 10 mL de água destilada para cada tratamento, e obtidas diluições de 10^{-1} 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} e 10^{-5}. Do homogeneizado de branchoneta e de água do cultivo foram retirados 0,1 mL de cada diluição semeados em placas de Petri estéreis contendo Ágar TCBS (Tiossulfato Citrato Bile Sacarose) e Ágar Cetrimide (BD Pseudosel Ágar), e incubadas por 24h a 37-40°C. Para cada diluição e amostra de água foram semeadas em triplicata totalizando 36 placas. As colônias bacterianas, de acordo com suas características visuais e morfológicas a olho nu, foram contadas e multiplicadas pelo fator diluição e posteriormente, uma colônia foi isolada em lâmina e foi realizado o teste de Gram através do método de coloração de Gram (1884). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200).

2.7 Extração de DNA e Condições de PCR para identificação do WSSV

As branchonetas da espécie (*D. brasiliensis* obtida após o experimento foram transportadas vivas para o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LAPLIC) localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte para a extração de DNA. O DNA total foi extraído de três pools (R1, R2 e R3) com três branchonetas em cada, utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen de acordo com as instruções do fabricante.

O método de detecção do WSSV foi o nested-PCR recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (OIE, 2018). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 1µl de DNA total, 0,25 µM de cada *primer* (146F1 e 146R1), tampão de reação 1X, 2,5 mM de MgCl2, 0,2 mM de cada dNTP e 1,0 U de DNA polimerase (Promega). A amplificação foi conduzida usando o *Life Touch Thermal Cycler* TC-96 (BIOER) e o seguinte ciclo térmico para os dois passos da PCR: desnaturação inicial a 94 ºC por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94ºC por 1 minuto, anelamento a 55 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 2 minutos, com extensão final a 72 ºC por cinco minutos. A PCR aninhada foi realizada com as mesmas condições, usando 1,0µl do primeiro passo como molde e utilizando os primers 146F2 e 146R2. Os tamanhos esperados dos amplicons foram de 1447 e 941 pares de bases, respectivamente. Além disso, foram utilizadas amostras de DNA total de camarões infectados com WSSV como controle positivo e com água como controles negativo. Para verificar a eficiência da extração de DNA das amostras, foi utilizado um par de primers amplificando um gene para a ordem decápoda (143F e 145R), que amplifica um fragmento de 848 pb. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, na presença de brometo de etídio, utilizando um transluminador UV.

2.8 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa SigmaStat versão 3.5. Foi aplicado o teste One Way ANOVA para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Confirmada a diferença, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (SNK), com significância $p<0,05$.

3. Resultados e Discussão

Para os parâmentros de qualidade de água não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos da água em experimento de *D. brasiliensis* cultivadas em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probióticos (EMP) e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME).

Parâmetros físicos e químicos	Tratamentos		
	EM	EMP	EME
Temperatura (°C)	24,13 ± 0,15a	24,33± 0,28a	24,16±0,20a
Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})	5,11±0,06a	5,11±0,11a	5,17±0,29a
pH	7,6±0,09a	7,7±0,33a	7,7±0,07a
Amônia Tóxica (mg L^{-1})	0,009±0,01	0,001±0,0	0,006±0,0
Alcalinidade (mg$CaCO_3$ L^{-1})	100,20±4,02a	102,82±2,24a	96,68±5,46a
Dureza (mg$CaCO_3$ L^{-1})	64,08±2,23a	67±2,40a	62,57±7,04a

Os resultados referentes ao uso de probiótico no cultivo das branchonetas demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a sobrevivência, crescimento e biomassa (ANOVA, $p<0,05$) (Tabela 2).

O número de cistos total e por fêmea foi significativamente menor no Tratamento apenas alimentados com microalga *S. quadricauda* (EM) e alimentados ração comercial e microalga *S. quadricauda* (EME) (ANOVA, $p<0,05$). Braga *et al*., (2018) descrevem que infecções bacterianas em camarões promovem um processo de degeneração do espermatóforo nos machos com a presença de melanização, que tem sido frequentemente relacionada à ocorrência de vibrios, pseudomonas e micobactérias, afetando o desempenho reprodutivo das fêmeas. Além disso, infecções pela espécie *Vibrio sp*., também afetam o desenvolvimento de ampolas terminais de *Litopenaeus stylirostris*, fechando-a e consequentemente impedindo a liberação do espermatóforo causando falha no acasalamento da espécie (Braga *et al*., 2018).

A administração de probiótico durante o cultivo de branchonetas proporcionou melhor desempeho reprodutivo e evitou o aparecimento de sinais clínicos que indicassem a presença de bactérias patogênicas na branchoneta no Tratamento EMP. Já no Tratamento EME houve apenas um indivíduo com melanização nos filopódios (grau de melanização 1). Neste tratamento não foi usado probiótico na mesma concentração do Tratamento EMP, porém foi administrado na composição da ração comercial, assim podendo explicar o menor índice de melanização. O probiótico reportado para o cultivo de animais aquáticos tem como principais objetivos melhorar o crescimento, a sobrevivência, a atividade enzimática digestiva, resposta imune, como também melhorar a qualidade de água do cultivo através da manipulação da microbiota com a colonização de microrganismos benéficos (Vine *et al*., 2006; Maia *et al*., 2013; Costa *et al*., 2016).

Tabela 2: Desempenho zootécnico das branchonetas cultivadas durante 30 dias em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probióticos (EMP) e microalgas e ração EZ Larva a base de probiótico e Vpak® (EME).

Dezempenho zootécnico/reprodutivo	Tratamentos		
	EM	EMP	EME
Sobrevivência (%)	80±15,0a	100 ± 0,0a	98±2,0a
Comprimento final (cm)	2,29±0,47a	1,81±0,10b	1,73±0,01b
Peso final (g)	0,057±0,005a	0,052±0,009b	0,051±0,13b
Biomassa final (g)	2,22±0,29a	2,59±0,45a	2,52±0,68a
Cisto Total (g)	0,084±0,025a	0,103±0,007b	0,067±0,021c
Cisto (unid)	14.960±4808,81a	57.996±8885,21b	22.079±9516,02c
Cisto/Fêmea	690±18,19a	2.096±48,01b	988±6,55c

Entretanto, foi observado melanização no aparelho reprodutor do macho (Figura 1a e 1b), e da fêmea com ausência de cistos no ovissaco (Figura 1c), filopódios (Figura 1d), apêndice reprodutor (Figura 1e) e ausência de alimento no intestino (Figura 1f) das branchonetas no Tratamento EM e grau de melanização que variou de 0 a 3 (Tabela 3). Foram observados 10 indivíduos em processo de melanização a partir do 15° dia de Experimento em uma sequência de eventos: presença de pontos de melanização, intestino parcialmente cheio, intestino vazio, ausência na produção de cisto e natação errática.

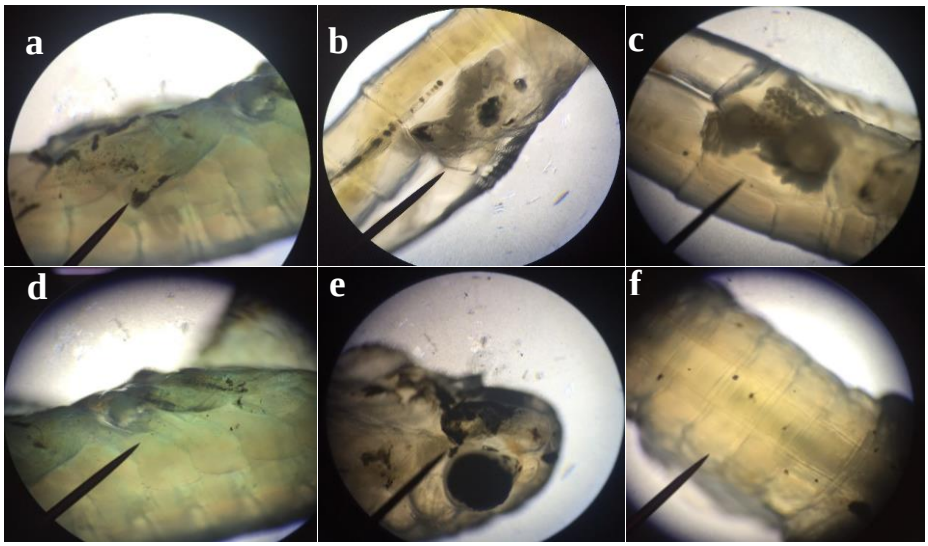


Figura 1: Regiões do aparelho reprodutor do macho (a e b) e da fêmea sem produção de cistos (c), filopódios responsáveis pela natação da branchoneta (d), apêndice reprodutor do macho localizado na cabeça (e) e ausência de alimento no intestino (f) que apresentaram melanização no Tratamento EM durante um mês de cultivo (4x).

Em crustáceos, a presença de doenças bacterianas resulta em sinais clínicos internos e externos. E quando atingidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Aeromonas*, os crustáceos apresentam manchas escuras na região do exoesqueleto, abdome, rostro, urópodes, pereiópodos e nas pinças, processo conhecido como melanização, em que graves infecções podem levar os organismos a morte. Além destes sintomas, infecções por bactérias podem causar doença vermelha (avermelhamento do animal), síndrome da concha solta (estrutura do exoesqueleto solta sobre a musculatura abdominal do animal) e doença branca do intestino, fazendo com que o indivíduo não se alimente ou perca sua capacidade natatória e reprodutiva, podendo chegar à morte (Jayasree *et al*., 2006; Joseph *et al*., 2014; Lai *et al*., 2015; AftabUddin *et al*., 2018).

No Tratamento EM em que houve a presença de melanização, após 48h foi evidenciado o crescimento de colônias em meio Ágar TCBS (seletivo para vibrios) nas

branchonetas e na água (Tabela 4). Foram observadas colônias pequenas, brilhantes, luminescentes e que submetidas ao teste de Gram, apresentaram forma características de vibrionaceas e cor púrpura característica. Os resultados da coloração de gram para as colônias crescidas em Ágar TCBS mostraram a presença de bactérias do tipo Gram-negativa. Para os tratamentos EMP e EME não houve o desenvolvimento de colônias em meio TCBS.

O ágar Cetrimide é um meio seletivo para o isolamento e contagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Após 24h em meio Cetrimide, nas amostras de branchonetas do Tratamento EM foi observada formação >200 UFC/g colônias com coloração amarelo e cinza leitosa (Tabela 5) e na avaliação de microscopia óptica apresentaram forma de bacilo, cor púrpura e Gram-negativa, características de *Pseudomonas aeruginosa*. Para os Tratamentos EMP e EME houve a formação de colônias também confirmando a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, porém o desempenho reprodutivo e zootécnico não foi afetado pela presença desta bactéria. De acordo com os resultados, o desempenho zootécnico das branchonetas no Tratamento EM foi afetado pela presença de bactérias do gênero *Vibrio*.

A contagem de colônias na água para ambos os meios foi menor quando comparadas às análises realizadas com as branchonetas (Tabela 4 e 5). A menor contagem de colônias encontrada em água não necessariamente está relacionada com a contagem encontrada nos animais, uma vez que, a água é um elemento constantemente renovável, o que não ocorre com os animais (Mendes *et al*., 2009).

306 Tabela 3: Avaliação externa da área afetada a partir do 15° dia de cultivo e grau de melanização em branchoneta *D. brasiliensis* cultivadas em
307 aquários com alimentação a base de microalgas (EM).

Indivíduo/Sexo	Área afetada					Grau de melanização
	Intestino vazio	Ovissaco vazio (Cooloração esbranquiçada	Filapódios	Aparelho reprodutor	Cabeça	
1. Fêmea	+	+	+			3 (Grave)
2. Fêmea	+	+	+			3 (Grave)
3. Fêmea	+	+	+			3 (Grave)
4. Fêmea			+			1 (Leve)
5. Fêmea			+			1 (Leve)
6. Macho	+		+	+		3 (Grave)
7. Macho	+		+			3 (Grave)
8. Macho			+	+		3 (Grave)
9. Macho			+		+	2 (Moderada)
10. Macho			+		+	2 (Moderada)

Tabela 4: Contagem de colônias de *Vibrio* spp. em branchoneta *D. brasiliensis* e na água de cultivo em aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probiótico (EMP) e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME).

Amostras	Contagem Meio TCBS (UFC/mL $^{-1}$)					
	EM		EMP		EME	
Colônias	Verde	Amarela	Verde	Amarela	Verde	Amarela
Água	$2x10^3$	$2,4x\ 10^4$	AUSENTE		AUSENTE	
Branchoneta	$4,3x10^5$	$4x10^5$	AUSENTE		AUSENTE	

Tabela 5: Contagem de *Pesudomonas aeruginosa* em branchoneta *D. brasiliensis* e na água de cultivo dos aquários com alimentação a base de microalgas (EM), microalgas e uso de probiótico (EMP) e microalgas e ração comercial a base de probiótico e Vpak® (EME).

Amostras	Contagem Meio Cetrimide (UFC/mL $^{-1}$)					
	EM		EMP		EME	
Colônias	Amarela	Cinza	Amarela	Cinza	Amarela	Cinza
Água	$2x10^4$	$9,6x10^4$	AUSENTE	>200	AUSENTE	$4,9x10^3$
Branchoneta	>200	>200	AUSENTE	>200	AUSENTE	>200

A incidência de bactérias e vírus durante o cultivo de organismos aquáticos pode proporcionar desequilíbrio entre o ambiente, animal cultivado e o patógeno (Tríade epidemiológica) de modo a afetar a produção aquícola em termos de qualidade (Carvalho *et*

al., 2015; Nunes e Feijó, 2017). Portanto, este trabalho demonstra que a utilização de probióticos reduz a incidência de prejuízos causados por algumas bactérias patogênicas.

Alguns vírus, tais como o WSSV que acomete o cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* são vetorizados por diversos organismos, inclusive por alguns utilizados em sua alimentação, tais como biomassa de artêmia. A branchoneta tem sido alvo de estudo para uso como alimento vivo ou inerte adicionada na formulação de ração para a alimentação de camarão, no entanto deve haver cuidados referentes aos riscos sanitários durante o cultivo, uma vez que o alimento ofertado vivo ou inerte pode ser portador de doenças para animais cultivados. Neste trabalho, resultado da PCR foi negativo para a presença do vírus da mancha branca nas branchonetas para todos os tratamentos.

4. Conclusão

O uso de probiótico e ração comercial possibilitou a inibição de espécies do gênero *Vibrio* favorecendo um maior desempenho reprodutivo e sanidade da espécie *D. brasiliensis* em condições naturais. É possível que a capacidade de adesão e consequente colonização de bactérias benéficas no trato gastrointestinal favoreceram maior produção de cistos, que por competição evitaram a colonização de bactérias patogênicas (naturalmente encontradas no ambiente de cultivo). Desta forma, o uso de probiótico demonstrou eficiência no controle de enfermidades bacterianas em branchonetas em condições experimentais. Esta eficiência foi estabelecida a partir dos resultados da ocorrência de melanização, em que foi possível estabelecer um indicador do estado patológico do animal a partir do grau de melanização.

5. Referências

AftabUddin, S., Roman, W. U., Hasan, C. K., Ahmed, M., Rahman, H., Siddique, M. A. M. 2018. First incidence of loose-shell syndrome disease in the giant tiger shrimp Penaeus

358 monodon from the brackish water ponds in Bangladesh. Journal of Applied Animal
359 Research 46 (1): 210-217. https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1285771.
360 Apha. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th edition.
361 American Public Health Association, Washington DC.
362 Braga, A., Lopes, D., Magalhães, V., Klosterhoff, M., Romano, L., Poersch, L. Wasielesky,
363 W. 2018. Infertility of biofloc-reared Litopenaeus vannamei males associated with
364 aspermatophore mycobacterial infection: Description of the pathologicalcondition and
365 implications for the broodstock management and larval production. Aquaculture 492: 357-
366 360. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.039.
367 Carvalho, E., Belém-Costa, A., Porto, J. I. R. 2015. Biochemical identification of pathogenic
368 bacteria isolates of ornamental fish in the state of Amazon. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.
369 16 (1): 170-178. http://www.rbspa.ufba.br.
370 Chu, S. P. 1942. The influence of the mineral composition if the medium on the growth of
371 planktonic algae. J. Ecol. 30: 284-325. https://www.jstor.org/stable/2256574.
372 Costa, A. H.; Ribeiro, K.; Silva-Júnior, W. P.; Pontes, C. S. 2016 Avaliação de probióticos
373 sobre parâmetros de desempenho de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. Bol. Inst. Pesca
374 42(2): 295-305. https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n2p295.
375 Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180 (1): 147–165.
376 https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8.
377 Gonçalves, P. M. R. 2004. O pescado e as bactérias do seu meio ambiente. Higiene Alimentar
378 18 (116/117): 29-32.
379 Gram C. 1884. Uber die isolirte Farbung der Schizomyceten in Schnitt- und
380 Trockenpreparaten. Fortschr. Med. 2: 185-189.
381 https://doi.org/10.1055/s-0029-1209285.

382 Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R. 2006 Characterization of *Vibrio spp*. Associated with
383 Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the word
384 Aquaculture Society, 37 (4): 10. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x.
385 Joseph, F. R. S., Latha, N. P., Ravichandran, S., Devi, A. R. S., Sivasubramanian, K. 2014.
386 Shell disease in the Freshwater crab, Barytelphusa cunicularis. International Journal of
387 Fisheries and Aquatic Studies, 1(3):105-110.
388 https://pdfs.semanticscholar.org/b59a/f9b61b5ea6abf4306222d599045c1a0eb91c.pdf.
389 Lai, H. C., Ng T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang,
390 S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguch, H., Lo, C. F., Aoki, T.,
391 Wang, H. C. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in
392 shrimp. Fish & Shellfish Immunology 47: 1006-1014.
393 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008.
394 Lopes, J. P., Silva, T. A., Gomes, D. S., Rangel, A. C. M. 2007. Utilização do anelídeo
395 enquitréia *Enchytraeus albidus*, na alimentação do niquim *Lophiosilurus alexandri* durante
396 a alevinagem inicial. Rev. Brás. Engª. Pesca 2 (1), 156-166.
397 https://doi.org/10.18817/repesca.v2i1.43.
398 Maia, E. P., Modesto, G. A., Brito, L. O., Olivera, A., Gesteira, T. C. V. 2013. Effect of a
399 commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp
400 farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. Lat. Am. J. Aquat. Res. 41(1): 126-
401 137. http://dx.doi.org/103856.
402 Mendes, E. S., Lira, S. F., Góes, L. M. N. B., Dourado, J., Mendes, P. P., Alves, C. A. B.
403 2009. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em
404 Pernambuco. Ciência Animal Brasileira 10(4), 1191-1199. Disponível em: <
405 https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/2264> Acesso: 15 Jan 2019.

406 Cuéller-Anjel, J., et al. 2014. Guía técnica - Patología e imunología de camarones penaeidos.
407 2° Edición. OIRSA, Panamá. 382p.
408 Niu, Y., Defoirdt, T., Baruah, K., Wiele, T. V., Dong, S., Bossier, P. 2014. *Bacillus sp*. LT3
409 improves the survival of gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) larvae challenged
410 with *Vibrio campbellii* by enhancing the innate immune response and by decreasing the
411 activity of shrimp-associated vibrios. Veterinary Microbiology 173, 279–288.
412 http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.007.
413 Nunes, A. J. P.; Feijó, R. G. 2017. O vírus da mancha branca e a convivência no cultivo de
414 camarão marinho no Brasil. Panorama da Aquicultura. Edição 162. Disponível em: <
415 https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-
416 cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/> Acesso em 14 jan. 2019.
417 OIE (World Organization for Animal Health). OIE-Listed iseases, infections and infestations
418 in force in 2019. https://www.oie.int/animal-health-inthe-world/oie-listed-diseases-2019/.
419 OIE (World Organization for Animal Health). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic
420 Animals (2018). Chapter 2.2.8. Infection with white spot syndrome vírus.
421 http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=sommaire.htm.
422 Parente, L. S., Costa, R. A., Vieira, G. H. F., Reis, E. M. F., Hofer, E., Fonteles, A. A., Vieira,
423 R. H. S. F. 2011. Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho
424 Litopenaeus vannamei oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil. Braz. J.
425 Vet. Res. Anim. Sci. 48 (1): 46-53. https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000100006.
426 Ribeiro, P. A. P., Costa, L. S.; Logato, P. V. R. 2008 Probióticos na aqüicultura. Revista
427 Nutritime, Viçosa 6(1): 837-846.
428 https://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/080V6N1P837_846_JAN2009_.p
429 df.

Santos, L. L. S. et al., 2019. A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921)) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching. Aquaculture 512: 734350. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350.

Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E., 2009. Review: immunity mechanisms in crustaceans. Innate Immun 15, 179–188. http://dx.doi.org/10.1177/1753425909102876.

Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H. 2006 Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews 30*(3): 404–427. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x.

CAPÍTULO III

Artigo 3

MODELO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CISTOS DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis* EM SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO

Leila Laise S. Santos[1,2], Alexandra S. do Nascimento[2], Emerson Moreira de Aguiar[2], Thiago B. Cahú[1], Fabiana R. A. Câmara[2], Ranilson de S. Bezerra[1]

Será submetido à Revista Será submetido à Revista *Aquaculture*

MODELO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CISTOS DE BRANCHONETA *Dendrocephalus brasiliensis* EM SISTEMA DE REUSO DE ÁGUA

Leila Laise S. Santos[1,2], Alexandra S. do Nascimento[2], Emerson Moreira de Aguiar[2], Thiago B. Cahú[1], Fabiana R. A. Câmara[2], Ranilson de S. Bezerra[1]

[1]*Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP: 50670-901 – Recife (PE), Brasil*.

[2]*Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Escola Agrícola de Jundiaí, RN 160 KM 3, s/n – CEP: 59280-000 – Macaíba (RN), Brasil*.

Autor por correspondência: R. de S. Bezerra; e-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

A branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*) é um microcrustáceo com potencial nutricional para alimentação de peixes e camarões. Entretanto, um dos gargalos do seu uso como alimento vivo é a eficiência de eclosão de cistos e ausência de um modelo de produção consolidado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico da branchoneta e sua qualidade nutricional em diferentes densidades, propondo uma metodologia de produção com uso de probiótico em sistema de reuso de água. O método de cultivo em diferentes densidades foi proposto para testar a melhor condição e maior produção dentro do sistema e teve duração de 60 dias. Foram testadas inoculações de 1,2 e 3 gramas de cistos de branchoneta, para os Tratamentos 1G, 2G e 3G, respectivamente em caixas de 1000 litros, totalizando 9 caixas de produção. Os indivíduos foram alimentados com *Scenedesmus quadricauda* nas concentrações de $8{,}5x10^6$ cel.ml^{-1} no Tratamento 1G, $13{,}5x10^6$ cel.ml^{-1} no Tratamento 2G e $23{,}5x10^6$ cel.ml^{-1} no Tratamento 3G, proporcionais as inoculações de cistos.

Dados mostraram também que o Tratamento 3G possibilitou uma produção maior biomassa e cisto dentro do sistema. O Tratamento com inoculação de 1 grama/m³ é interessante para os produtores aquícolas que desejam utilizar um alimento vivo maior, uma vez que neste os indivíduos apresentaram maior tamanho quando comparado as demais inoculações. Já o tratamento com inoculação de 3 gramas/m³ é interessante para quem deseja produzir bastante cisto. Entretanto, são necessários mais testes com inoculações maiores para verificar a capacidade suporte do sistema de recirculação de água com o uso de probiótico. E diante da boa qualidade nutricional e a produção de biomassa e cistos produzidos, a branchoeneta pode ser utilizada como fonte de alimento vivo, podendo atender a pequenos produtores de peixes ornamentais a partir da produção de biomassa e produção de cistos para venda.

Palavras-chave: Alimento vivo; Branchoneta; Recirculação de água.

Abstract

Branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*) is a microcrustacean with nutritional potential for fish and shrimp feeding. However, one of the bottlenecks of its use as a live food is cyst hatching efficiency and the absence of a consolidated production model. Thus, this work aimed to evaluate branchoneta's zootechnical performance and its nutritional quality at different cultivation densities, proposing a production methodology using probiotic in water reuse system. The method of cultivation at different densities was proposed to test the best condition and highest yield within the system, taking 60 days of duration. It was tested inoculations of 1, 2 and 3g of branchoneta cysts for the treatments 1G, 2G and 3G, respectively in 1000 liter boxes, a total of 9 production boxes. The individuals were fed with *Scenedesmus quadricauda* at the concentrations of *8*.5x10^6 cel.ml^{-1} in treatment 1G; 13.5x10^6 cel.ml^{-1} in treatment 2G; and 23.5x106 cel.ml^{-1} in 3G, proportional to cysts inoculation ratio. Data also demonstrated treatment 3G enabled a greater biomass and cyst production in the

system. The treatment containing 1g/m^3 is relevant for aquatic producers who expect to achieve larger live food, which was a substantial increase, obtained in comparison to the others inoculations treatments. On the other hand, treatment 3 g/m3 is relevant for higher cysts productions amounts. However, further testing with larger inoculations is required to verify the carrying capacity of the water recirculation system using probiotics. And given the good nutritional quality and the biomass and cysts production, branchoeneta may be used as a source of live food, being suitable to small producers of ornamental fish based from biomass and cysts production and for sale.

Keywords: Live Food; Fairy-shrimp; Water recirculation.

1. Introdução

O alimento vivo na aquicultura contribui com nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência de peixes e camarões. E a utilização de alimentos vivos é uma das formas mais eficientes, em termos de custo/benefício, para diminuir o custo e os impactos ambientais da aquicultura (Kubitza, 2003; Brito *et al*., 2009).

A branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis)* é um microcrustáceo com potencial uso como alimento vivo na aquicultura, por apresentar elevado teor protéico (67,05% PB), podendo chegar a um comprimento médio de 2,5 cm e, sendo capaz de suprir as necessidades protéicas de peneídeo, alevinos de espécies onívoras e carnívoras, ou qualquer outro animal aquático com potencial para o cultivo durante todas as fases de vida (Lopes *et. al*., 2007). É uma espécie que habita tipicamente lagoas temporárias de água doce, poças, açudes e riachos formados durante a estação chuvosa e seu ciclo de vida curto, que se resumo consiste em ovo (cisto), naúplio, metanáuplio, juvenil e adulto. Na natureza, os adultos com 10 dias após a eclosão dos náuplios, iniciam o período reprodutivo (reprodução sexuada) com produção de cistos em desovas parceladas. Os cistos são liberados pelas fêmeas e permanecem

sedimentados no fundo de lagos temporários. Durante o período de estiagem, passam por um processo de desidratação e, durante o período chuvoso, são reidratados proporcionando a eclosão dos náuplios e continuidade da espécie (Lopes *et al*., 2008). Regiões com baixa umidade relativa do ar, baixa precipitação pluviométrica e elevadas temperaturas do ar, criam microhabitats de poças temporárias favorecendo o desenvolvimento e a produção de biomassa e cistos de branchoneta (Oliveira *et al*., 2000; Marengo, 2008).

Em cativeiro é necessário simular as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da espécie. Desta forma, é possível realizar a produção de biomassa e cistos não necessitando realizar a extração da branchoenta no habitat natural. Para uma produção em larga escala, é necessário que haja disponibilidade de elevados volumes de água doce, uma vez que o manejo alimentar e a coleta de cistos requerem diárias reduções no nível de água dos tanques. Portanto, o reuso da água é primordialmente abordado como uma técnica que possibilita uma produção sustentável quanto à disponibilidade de água, evitando o seu gasto excessivo, e que vem sendo difundido de forma crescente na aquicultura (Faggion *et al*., 2009; Macedo e Sipaúba-Tavares, 2010).

O uso da branchoneta como alimento é limitado pela ausência de um modelo de produção em larga escala. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico da branchoneta e sua qualidade nutricional quando cultivada à diferentes densidades em sistema de recirculação.

2. Material e Métodos

O experimento teve duração de 60 dias e foi realizada no Laboratório de Produção de Alimentos Vivos da Escola Agrícola de Jundiaí, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

2.1 Sistema de cultivo

O sistema de cultivo da branchoneta foi mantida em fotoperíodo natural 12:12h (luz:escuro) e temperatura ambiente e consistiu de 12 caixas de 1000 litros (CP) com saída de água no centro com malha de 800 µm para trocas de água e realização da coleta de cistos, de modo a evitar que as branchonetas escapassem durante o manejo. A tubulação de entrada (TE) funcionou a partir de uma bomba no tanque de cultivo de microalgas (CM) responsável pela alimentação dos animais e da caixa reserva (CR) para reposição por evaporação. Em cada caixa foi inserido um registro para controlar a saída de água, que por gravidade chegava ao sistema de tratamento através da tubulação de saída (TS). A qualidade da água após o uso foi mantida, a partir de um sistema de tratamento composto por uma caixa de decantação (CD) e outra de filtração mecânica (CF). Em seguida, por controle de nível a água entrava na caixa de cultivo de microalgas (CM) para fertilização. Nesta, recebia tratamento com cloro, posterior descloração com tiossulfato de sódio e fertilização com nutrientes inorgânicos; em seguida, era adicionado 20L do inóculo da microalga *Scenedesmus quadricauda*. A microalga foi mantida em fase de crescimento exponencial através da adição periódica de nutrientes, e bombeada diariamente para as caixas de produção (CP) para alimentação das branchonetas (Figura 1).

A coleta dos cistos e troca de água ocorreu por meio do registro localizado na parte inferior de cada caixa de produção, onde era acoplado um coletor com malha de 75µm para retenção dos cistos.

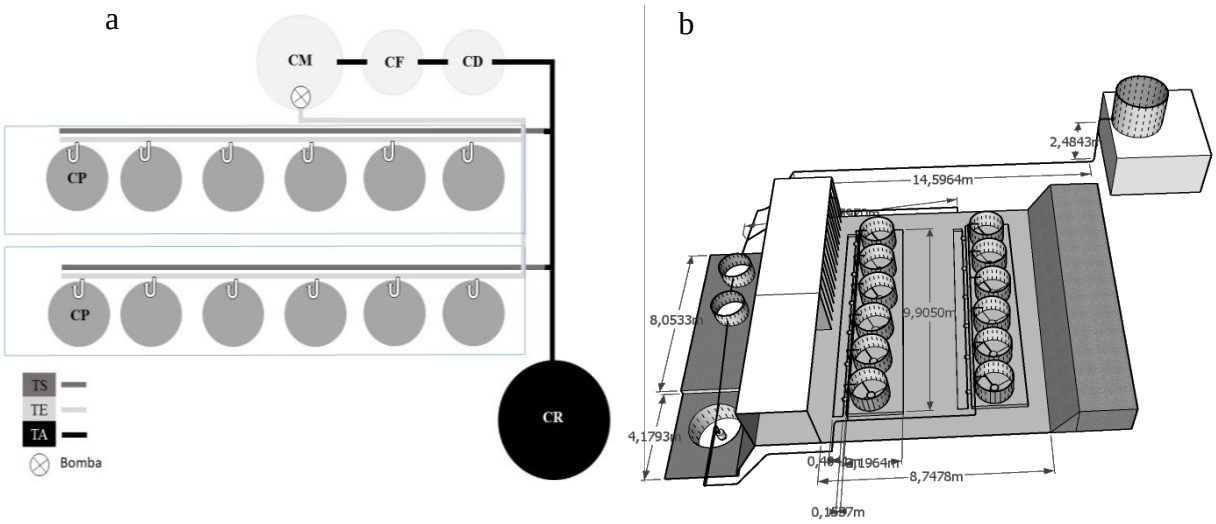


Figura 1: (a) Desenho esquemático do Sistema de cultivo de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis.* CD: Caixa de decantação; CF: Caixa de filtração; CM: Cultivo de Microalgas; CP: Caixa de produção; TS: Tubulação de saída; TE: Tubulação de entrada; TA: Tubulação de água reserva; CR: Caixa reserva. (b) Layout do Sistema de cultivo de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis*.

2.2 Delineamento Experimental

O ensaio experimental foi realizado na estrutura de produção descrita anteriormente. O uso de probiótico foi definido a partir dos resultados obtidos em experimentos piloto, que mostrou efeitos positivos na sanidade em cultivo de branchoneta. O experimento consistiu em três tratamentos e três réplicas, com inoculação de 1g (Tratamento 1G), 2g (Tratamento 2G) e 3g (Tratamento 3G) de cistos de branchoneta, aproximadamente com 8.100, 36.200 e 54.300 cistos cada m^3, respectivamente.

A densidade de microalgas (cél.ml^{-1}) utilizada na alimentação das branchonetas foi definida de acordo com os resultados obtidos em teste piloto para avaliar a taxa de ingestão e filtração. O alimento foi bombeado da caixa de cultivo de microalgas inserida no sistema de produção para as caixas das branchonetas de modo a obter $8{,}5x10^6$ cel.ml^{-1} no tratamento 1G,

$13,5x10^6$ cel.ml^{-1} no tratamento 2G e $23,5x10^6$ cel.ml^{-1} no tratamento 3G. Foi utilizado probiótico DB-AQUA ($0,2g/m^3$) e administrado duas vezes por semana, após a troca de água.

A cepa da microalga *Scenedesmus quadricauda* D115 foi isolada e cedida pelo Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB) e o cultivo foi mantido em meio CHU (Chu, 1942) no Laboratório de Produção de Alimento Vivo da EAJ. Após atingir em laboratório o volume de 20L, foi transferida para a caixa de cultivo inserida no sistema de reuso de água e fertilizada com ureia e fosfato na proporção 10:1. Os cistos utilizados no ensaio experimental foram provenientes de cultivos anteriores realizados na Escola Agrícola de Jundiaí.

2.3 Parâmetros físicos e químicos da água

Para todos os tratamentos, os parâmetros físicos e químicos foram monitorados duas vezes por semana. O oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura (°C) foram medidos com oxímetro, modelo MO-900, diariariamente pela manhã e tarde. Os valores de pH, alcalinidade ($mgCaCO_3$ L^{-1}), dureza ($mgCaCO_3$ L^{-1}) e amônia (mg L^{-1}) tóxica foram mensurados duas vezes por semana, sendo o pH obtido a partir do pHmetro de bancada, modelo mPA-210, a alcalinidade e dureza da água seguindo a metodologia descrita em Apha, 1985 e amônia tóxica a partir da metodologia de Golterman et al., (1978) para amônia total em função do pH e temperatura.

2.4 Dezempenho Zootécnico

Foram determinados a taxa de crescimento semanal, biomassa final, número de indivíduos e quantificação de cistos em cada unidade experimental. Para verificar a taxa de crescimento foram retirados aleatoriamente 50 indivíduos por semana e mensurado o comprimento com auxílio de um paquímetro digital fibra de carbono, modelo NOVE54. Ao

término do período experimental o total de indivíduos foi concentrado em um balde com 11 litros de água e retiradas três amostras com becker de 500ml para a contagem e realização da média amostral. O máximo da umidade dos organismos foi removida e pesados em balança analítica (Shimadzu AY 220) para a obtenção da biomassa final.

Nas caixas de produção, os cistos foram coletados duas vezes por semana durante a troca parcial de água em cada caixa de produção e retidos em coletor com malha de 75 µm. A limpeza dos cistos foi realizada com jatos d'água em uma sequência de malhas de 600, 300 e 75µm, ficando retidos nesta última. Os cistos foram submetidos a um processo de secagem ao sol em bacias plásticas durante 15 dias e em seguida selecionados com uso de malha de 150µm para maximizar a retirada de impurezas (Santos, *et a*l., 2019).

A produção e contagem de cistos total foi quantificada no final para cada unidade experimental. O peso total de cistos (g) foi verificado em balança analítica e para a contagem foi utilizada uma média de três amostras de 0,02 gramas cistos e o resultado foi extrapolado para o peso total da amostra. Os cistos produzidos foram armazenados em frascos de vidro em dessecador para posteriores eclosões.

2.5 Taxa de filtração e ingestão

A taxa de filtração e ingestão foram calculadas durante o período experimental para verificar se a quantidade de microalga fornecida como alimento foi suficiente para promover um adequado desempenho zootécnico das branchonetas. Para isto, a cada 24 h, foi realizada análise quantitativa das microalgas presentes na água antes e após a oferta de alimento, com o auxílio da Câmera de Newbauer.

A taxa de filtração (mL ind^{-1} $hora^{-1}$) foi definida como o volume de água que é separado das partículas em suspensão pelo aparato filtrante dos organismos filtradores por unidade de tempo. Expressa pela equação proposta por Wetzel e Likens (2000):

$$G = V (\ln Co - \ln Ct)/(tN)$$

Onde,

G = taxa de filtração (mL indivíduo-1 hora-1);

V = volume da amostra na unidade experimental;

N = número de indivíduos no frasco;

t = duração do experimento em horas;

Co = concentração inicial da alga;

Ct = concentração final da alga;

Ln = logaritmo neperiano (usado para valores que evoluem de maneira exponencial).

A taxa de ingestão de *S. quadricauda* pelas branchonetas foram calculadas e expressas como o número médio de células algais ingeridas (cels ind^{-1} $hora^{-1}$) a cada 24h, durante todo o período de duração do experimento. Sendo utilizada, a seguinte equação, proposta por Paffenhöffer (1971):

$$I = V (Co - Ct)/(tN)$$

Onde,

I = A taxa de ingestão (cels ind-1 hora-1);

V = volume da amostra no recipiente teste;

C0 = concentração inicial da suspensão algal;

Ct = concentração final da suspensão algal nos frascos experimentais;

t = tempo de duração do experimento (em horas);

N = número de branchonetas.

2.6 Composição centesimal/Químicas

As análises de composição centesimal/Químicas das branchonetas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Escola Agrícola de Jundiaí pelo Manual de Métodos para análise de Alimentos – INCT Ciência Animal (2012). Após a finalização do Experimento, os animais de cada réplica foram armazenados em sacos etiquetados e mantidas em freezer (-5 a -10 °C) para posterior análise. Para cada réplica dos tratamentos foram realizadas em triplicata as análises de umidade e peso seco (Avaliação da secagem definitiva utilizando estufa sem circulação forçada de ar), Proteína Bruta (Método de Kjeldahl, 1883), Extrato Etéreo pelo Método de Goldfisch (Silva e Queiroz, 2002), Carboidratos totais (Sniffen *et al*., 1992) e Poder calorífico (Oxygen Bomb Calorimeter).

2.7 Ánalise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa SigmaStat versão 3.5. Foi aplicado o teste One Way ANOVA para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Confirmada a diferença, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (SNK), com significância $p<0,05$.

3. Resultados e Discussão

Os parâmetros zootécnicos da branchoneta não foi interferido pela qualidade de água do cultivo, uma vez que não houve diferença significativa para os parâmetros analisados (ANOVA, $p>0,05$), exceto para oxigênio dissolvido, que reduziu significativamente com o aumento da densidade (ANOVA, $p<0,05$). A tabela 1 demonstra a média dos valores dos parâmetros físicos e químicos da água durante o período de cultivo, sendo considerados

dentro da faixa de conforto para a espécie *D. brasiliensis* (Kubitza, 2003; Lopes et al., 2008; Sá, 2012).

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos nos com inoculacões de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis.*

	Tratamentos		
Média/DV	1G	2G	3G
Amônia Tóxica (mg L^{-1})	0,01 ± 0,01a	0,004 ± 0,002a	0,007 ± 0,008a
Dureza (mg$CaCO_3$ L^{-1})	106,85 ± 3,52a	118,92 ± 9,57a	117,48 ± 2,98a
Alcalinidade (mg$CaCO_3$ L^{-1})	67,66 ± 10,92a	68,59 ± 10,50a	61,25 ± 2,43a
Temperatura (°C)	27,704 ± 0,45a	27,407 ± 0,51a	27,63 ± 0,45a
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	6,3 ± 0,2a	4,667 ± 0,20b	4,067 ± 0,05c
pH	7,06 ± 0,18a	7,03 ± 0,04a	6,98 ± 0,09a

O desempenho zootécnico das branchonetas em sistema de reuso de água, com relação à biomassa produzida e quantidade de cistos, foi significativamente mais elevado no Tratamento com maior inoculação de cistos (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 2 e 3).

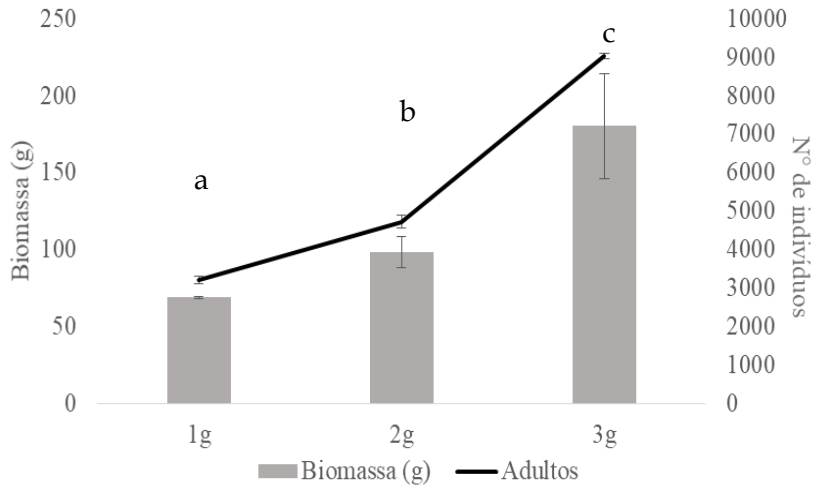


Figura 2: Biomassa (g) e número total de indivíduos nos tratamentos com inoculacões de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensis*.

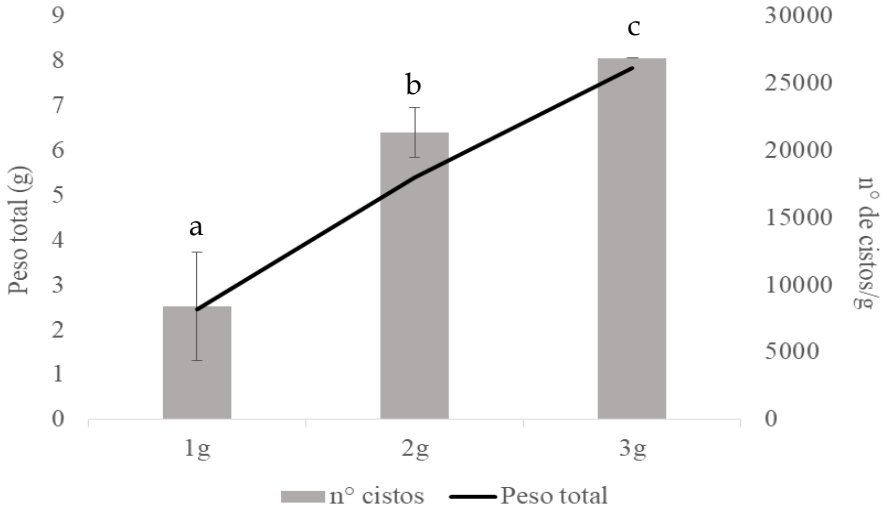


Figura 3: Produção total e número de cistos por grama (g) com inoculacões de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis*.

Em estudo realizado por Lopes et al. (2007) a produção média de cistos de branchonetas em viveiros escavados sem renovação de água foi de 20,75g e de biomassa 18,63kg durante 15 dias em 1.600m^3, com inoculação de 2g de cistos e alimentação natural.

No presente estudo, após 60 dias de cultivo foi obtida produção de aproximadamente 5,39±0,43g de cistos (21.333cistos/g) e 0,09831kg de biomassa em cada caixa d'água de $1m^3$, a partir da inoculação de 2g de cisto. Portanto, uma ampliação deste sistema de produção para $1.600m^3$, possibilitaria a produção de 8.624g de cistos e 157,2kg de biomassa, quando inoculados 2g de cistos; e quando inoculados 3g, a produção estimada seria de 12.528g de cistos (26.894 cistos/g) e 288kg de biomassa.

Em todos os tratamentos, houve crescimento significativo das branchonetas até a terceira semana de cultivo (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 4). No entanto, o tamanho dos indivíduos foi significativamente diferente entre os tratamentos, com valores de 1,22 ± 0,03 cm, 1,04 ± 0,01cm e 0,98 ± 0,02cm para os tratamentos 1G, 2G e 3G, respectivamente, demonstrando que uma maior densidade de cultivo resulta em indivíduos de menores tamanhos ao final do experimento (ANOVA, $p<0,05$). Estes resultados corroboram com Lopes et al. (2011), que verificaram menores tamanhos das branchonetas em alta densidade de estocagem. Segundo Bittencourt *et al*. (2010), a densidade de estocagem interfere significativamente no desempenho zootécnico e na composição centesimal dos crustáceos.

Diante destes resultados, a depender do tamanho da branchoneta que se deseja ofertar na alimentação de peixes e camarões pode-se optar por uma das densidades de inoculações testadas. Assim como, se o interesse for a comercialização de cistos, optando-se pela inoculação de 3 gramas por m^3, já que quanto maior a inoculação foi obtido um número maior de cistos.

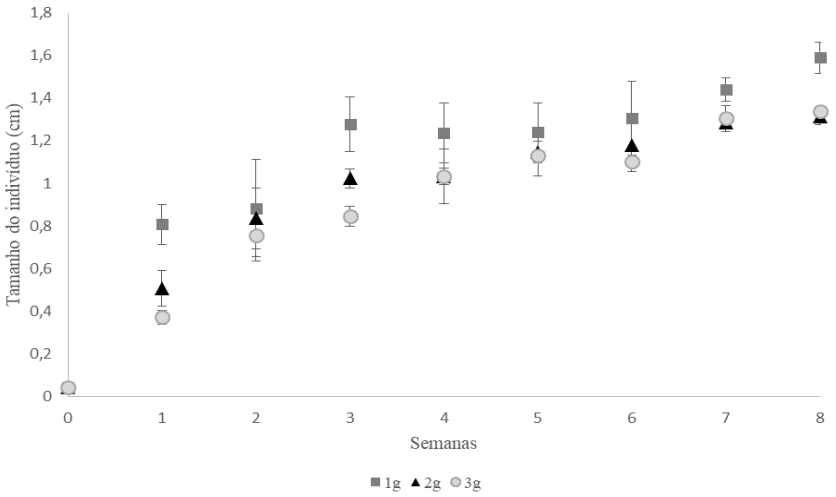


Figura 4: Crescimento semanal (cm) com inoculacões de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis.*

A composição centesimal apresentou relação inversamente proporcional entre a biomassa produzida e o teor de proteína, e relação diretamente proporcional entre a biomassa e o teor de lipídio, havendo diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabela 2). O perfil lipídico pode indicar a relação fisiológica entre um organismo e seu ambiente, sendo as gorduras o principal substrato energético em crustáceos (Allen, 2000; Pond *et al*., 2000; Rosa e Nunes, 2003). Allen *et al*. (2000) observaram maiores reservas lipídicas em camarões da espécie *Nematocarcinus Gracilis*, *Rimicaris exoculata* e *Alvinocaris markensis* resultante de baixos teores de oxigênio dissolvido. Molina et al., (2017) verificou aumento nos valores de triacilglicerois em *Litopenaeus vannamei* em condições de alta densidade.

No presente trabalho, o aumento do teor de lipídio e redução de proteína ocorre em condições de estresse, ocasionado pela maior densidade e baixo teor de oxigênio. Deste modo, a branchoneta parece preferencialmente usar proteína para a manutenção da homeostase energética (produção de ATP) através da Gliconeogênese (Chittó *et al*., 2009; Martins *et al*., 2011). Em contrapartida, ocorre síntese de lipídio, e estas reservas parecem ser utilizadas

quando ocorre melhora nas condições de cultivo, como menor densidade e níveis mais elevados de oxigênio dissolvido. Em trabalhos relacionados ao metabolismo energético de crustáceos, os valores dos teores de lípideos e proteínas são inversamente proporcionais em situações de reprodução e manutenção de energia (apenas para a sobrevivência do animal) (Braghirolli, 2015).

Tabela 2: Composição centesimal com inoculacões de 1,2 e 3 gramas por m³ durante o ciclo produtivo de 60 dias de *D. brasiliensis.*

	Tratamentos		
Composição (%)	1G	2G	3G
Umidade	92,71± 0,010a	92,03± 0,037a	94,79± 0,05b
Matéria Seca	7,31± 0,015a	7,94± 0,005b	5,21± 0,022c
Proteína Bruta	73,39± 0,005a	66,33± 0,010b	65,74± 0,04b
Extrato etéreo	5,42± 0,005a	5,66± 0,057b	8,91± 0,010c
Carboidratos totais	14,52± 0,025a	20,59± 0,005b	17,78± 0,016c
Poder colorífico (Kcal/g)	4,10± 0,00a	3,15± 0,001b	4,092± 0,00b

As taxas de filtração tendem a diminuir com a redução do teor de oxigênio e o aumento da densidade dos animais e estresse como mecanismo de adaptação para diminuir a demanda energética e consequentemente o consumo de oxigênio. Em águas correntes ou em ambiente com movimentação de água por aeração, o aumento do fluxo exige maior atividade natatória contra a correnteza e, consequentemente, maior taxa de filtração (Bernice, 1971; Brito *et al*., 2010; Silva-Castiglioni *et al*., 2012). Durante o presente estudo, a taxa de filtração diminuiu com o aumento da densidade e redução no teor de oxigênio dissolvido, apresentando valores de 129 $mL.ind^{-1}.h^{-1}$, 91 $mL.ind^{-1}.h^{-1}$ e 48 $mL.\ ind^{-1}.h^{-1}$para os Tratamentos 1G, 2G e

3G, respectivamente (Figura 5a). No entanto, a taxa de filtração não influenciou na taxa de ingestão com média de $9,9x10^5$ cel.ind^{-1}.h^{-1} para o tratamento 1G, $10x10^5$ cel.ind^{-1}.h^{-1} para o tratamento 2G e $7,6x10^5$ cel.ind^{-1}.h^{-1} no tratamento 3G (Figura 5b).

A partir do 6º dia de cultivo as branchonetas já se encontram na fase adulta com diferenciação de macho e fêmea. Até o 13º dia ocorre aumento da taxa de ingestão, que volta a cair no 14° dia e em seguida se mantém estável com pequenas oscilações durante toda a fase de produção de cistos.

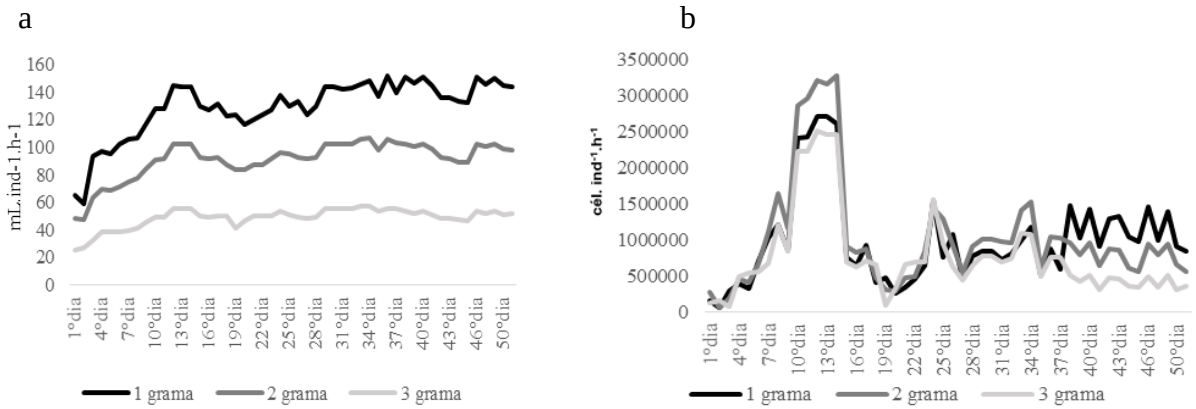


Figura 5: (a) Taxa de Filtração (G) e (b) ingestão (I) diária com inoculações de 1,2 e 3 gramas por m³ durante 60 dias de cultivo da espécie *D. brasiliensi.*

4. Conclusão

A produção de biomassa de branchonetas e cistos apresentou viabilidade produtiva no sistema de reuso de água com maior facilidade de manejo em vista do menor espaço de produção, quando comparado a viveiros. Além disso, o sistema proporciona uma redução do descarte de matéria orgânica no meio ambiente. Neste sistema, a quantidade de cistos inoculados influencia na produtividade final de biomassa e cistos. Porém, são necessários estudos para avaliar a capacidade suporte do sistema, de modo a verificar o platô em que se pode inferir a biomassa final e a quantidade de cistos produzidos, em função do número de cistos inoculados. A comercialização de cistos de branchoneta é escassa e de biomassa

inexistente, devido a sistemas de produção não consolidados e baixa taxa de eclosão de náuplios. Diante da produtividade obtida e boa qualidade nutricional da branchoneta cultivada neste sistema, a mesma pode ser facilmente produzida e utilizada como fonte de alimento vivo.

5. Referências

Allen, C. E.; Tyler, P. A.; Varney, M. S. 2000 Lipid profiles of Nematocarcinus gracilis a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. Hydrobiologia 440: 273–279. https://doi.org/10.1023/A:1004147900461.

Apha. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th edition. American Public Health Association, Washington DC.

Bernice, R. 1971. Food, Feeding and Digestion in Streptocephalus Dichotomus Baird (Crustacea: Anostraca. Hydrobiologia 38 (3-4): 507-520. https://doi.org/10.1007/BF00036556.

Bittencourt, F., Feiden, A., Signor, A. A., Boscolo, W. R., Lorenz, E. K., Maluf, M. L. F. 2010. Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários de pacus criados em tanques-rede. R. Bras. Zootec. 39 (11): 2323-2329. https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100002.

Braghirolli, F. M. 2015 Estudo sazonal do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de *Hyalella kaingang* (Crustacea, Hyalellidae) em ambiente natural. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 56p. http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/6205/2/471669%20-%20Texto%20Completo.pdf.

Brito, L. O.; Pimentel, L. F.; Marcelino, S. C.; Melo, V. F.; Costa, W. M.; Gálvez, A. O.2009. Efeito de duas estratégias de fertilização na composição do zooplâncton no cultivo de

Litopenaeus vannamei. Rev. Bras. Enga. Pesca 4(1). https://doi.org/10.18817/repesca.v4i1.130.

Brito, D.; Brito, R.; Pereira, G. 2010 Evaluación de las tasas de filtración e ingestión de *Dendrocephalus spartaenovae* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) com Pseudokirchneriella subcapita y Chlorella vulgaris en condiciones de laboratório. Interciencia 35 (2): 126-130. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=339/33913150008.

Martins, T. L. et al., 2011 Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part a: Molecular & Integrative Physiology 158 (4): 400-405. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.023.

Chittó, A. L. F. et al., 2009 Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challeged by salinity changes. Invertebrate Biology 128 (3): 261-268. https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2009.00173.x.

Chu, S. P. 1942 The influence of the mineral composition if the medium on the growth of planktonic algae. J. Ecol. 30, 284-325. https://www.jstor.org/stable/2256574.

Faggion, F.; Oliveira, C. A. S.; Christofidis, D. 2009 Uso eficiente da água: uma contribuição para o desenvolvimento sustentável da agropecuária. Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia 2 (1): 187-190. http://repositorio.unb.br/handle/10482/8127.

Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. Oxford: Blackwell Scientific, 1978. 214p.

Kjeldahl, J. 1883 Neue methode zur bestimmung des stick-stoffs in organischen korpern. Zeitschrift für Analytische Chemie 22: 366-382. https://doi.org/10.1007/BF01338151.

Kubitza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí: F. Kubitza. 229p.

Lopes J.P., Gurgel, H.C. B., Gálvez A. O., Pontes, C. S. 2007 Produção de cistos de "branchoneta" Dendrocephalus brasiliensis (Crustacea: Anostraca). Biotemas, 20 (2): 33-39. https://doi.org/10.5007/%25x.

Lopes, J.P.; Gurgel, H. C. B.; Araujo, A.; Pontes, C. S. 2008 Influência da inoculação de cistos na produção de biomassa de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 (Crustacea: Anostraca). *Ciênc. Agrotec* 32. 598-603. https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200039.

Lopes, J. P.; Gurgel, H. C. B.; Pontes, C. S. 2011 Comportamento reprodutivo de *Dendrocephalus brasiliensis*, Pesta 1921 (Crustacea: Anostraca). Ci. Anim. Bras 12 (4): 617-625. https://doi.org/10.5216/cab.v12i4.1044.

Macedo, C. F.; Sipaúba-Tavares, L. H. 2010. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. Bol. Inst. Pesca 36 (2): 149 – 163. pesca.sp.gov.br/36_2_149-163rev.pdf.

Marengo, J. A. 2008. Água e mudanças climáticas. Estudos avançados 22 (63). https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000200006.

Molina, J. P. A; Romo, A. R.; Pindaro, A. R.; Miranda, A. S.; Arjona, O.; Racotta, I. S. Influence of stocking density and exposure to white spot syndrome virus in biological performance, metabolic, immune, and bioenergetics response of whiteleg shrimp *Litopenaus vannamei*. Aquaculture 479 (1): 528-537. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.027.

Oliveira, A. G.; Silva, M. D.C. O.; Santos, A.J. G. 2000. Reproductive potencial of *Dendrocephalus brasiliensis* and its use in *Litopenaeus vannamei* larval feeding. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 14p.

450 Paffenhöffer, G.A. 1971 Grazing and ingestion rates of nauplii, copepodites and adults of the
451 marine copepod Calanus helgolandicus. Marine Biol. 11: 286-298.
452 https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00401275.pdf.
453 Pond, D. W.; Sargent, J. R.; Fallick, A. E.; Allen, C. E.; Bell, M. V.; Dixon, D. R. 2000 δ13C
454 values of lipids from phototrophic zone microplankton and bathypelagic shrimps at the
455 Azores sector of the Mid-Atlantic Ridge. Deep-Sea Res. 47: 121–136.
456 https://doi.org/10.1016/S0967-0637(99)00050-3.
457 Rosa R. A; Nunes M. L. 2003. Changes in organ indices and lipid dynamics during the
458 reproductive cycle of Aristeus antennatus, Parapenaeus longirostris and Nephrops
459 norvegicus (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. Crustaceana
460 75: 1095–1105. https://www.jstor.org/stable/20105494
461 Sá, M. V. C. 2012 Limnocultura - Limnologia para Aquicultura. Ed UFC. Fortaleza. 218p.
462 Santos, L. L. S. et al., 2019. A new process for nauplius production of the freshwater fairy-
463 shrimp Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921)) and the effect of enzymatic and
464 chemical treatment on hatching. Aquaculture 512: 734350.
465 https://doi.org/doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350.
466 Silva, D.J.; Queiroz, A.C. 2002 Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa:
467 Editora UFV. 235p.
468 Silva-Castiglioni, D et al., 2012 Adaptações metabólicas dos crustáceos ao déficit de oxigênio
469 ambiental. Brazilian Journal of Biosciences 10 (1): 114-123.
470 http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1876.
471 Sniffen, C. J. et al. 1992 A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II-
472 Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci. 70: 3562-3577.
473 https://doi.org/10.2527/1992.70113562x.

474 Wetzel, R. G.; Likens, G. E. 2000. Composition and biomass of phytoplankton.
475 Limnological Analyses. Springer, New York, NY. Exercise 10: 147-174p.

476

477

478

6 CONCLUSÃO

O trabalhou realizado gerou dados importantes para a cadeia produtiva da Aquicultura. Os experimentos mostraram ser possível acelerar a eclosão do náuplio, e a realização do seu cultivo através de um modelo de produção com o uso de probiótico, que possibilitou gerar dados sobre a produção de cistos e biomassa de Branchoneta. O sistema ainda proporcionou o reuso de água, diminuindo desta forma o desperdício, como também o descarte de matéria orgânica no meio ambiente. A branchoneta que apresenta hábito filtrador, teve seu desempenho zootécnico e reprodutivo influencido pela densidade de estocagem e uso do probiótico, respectivamente. Outrossim, a biomassa de Branchoneta gerada durante os experimentos apresentou significativo teor de proteína, que poderá ser aplicado na formulação de rações como substituição da farinha animal, na forma de biomassa congelada ou viva, em qualquer fase de seu cultivo, a depender da necessidade nutricional e do tamanho do animal cultivado. Desta forma, este trabalho contribuiu através do desenvolvimento de novas tecnologias para a produção da branchoneta, fornecendo subsídios científicos e tecnológicos a aplicação deste microcrustáceo na aquicultura.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T. J.; SASMAL, D. Influence of Salinity and Management Practices on the Shrimp (Penaeus monodon) Production and Bacterial Counts of Modified Extensive Brackishwater Ponds. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,** v. 9, p. 91-98. 2009.

AKHTER, N.; WU, B.; MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associ. with aquaculture: A review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p.733–741. 2015.

ÁLVAREZ, J. D. R.; AGURTO, C.; OBREGÓN, J.; PEROZA, L. Detection of *baculovirus penaei* and cases of Vibriosis in Litopenaeus vannamei and *L. stylirostris* on a Farm on the Coast of Venezuela. **Revista Ciêntífica, FCV-LUZ**, v. 13, n. 4, p. 255-262. 2003.

AMARAL, A. B. L. **Produção de *Dendrocephalus brasiliensis* pesta, 1921 alimentado com *Chlorella vulgaris* em sistema experimental de cultivo**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Dissertação de Mestrado). 74p. 2013.

ANDRADE, L. A. R.; AZEVEDO, T. M. P. Manejo experimental de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) alimentados com ração comercial e pre/probiótico. **Pubvet**, v. 12, n. 8, p. 1-9. 2018.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana**. Universidade Federal da Paraiba. Programa de Pós-Graduação em Química (Dissertação de Mestrado). 89p. 2007.

ARAUJO, J. A.; NORÕES, A. K. M.; MONTEIRO, J. V.; ARAÚJO, R. C. P; SILVA, F. P. Eficiência produtiva das fazendas de carcinicultura no Estado do Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 1. 2018.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science** v. 115, p. 66-77. 2017.

BELK, D.; BRTEK, J. Checklist of Anostraca. **Hidrobiologia**, v. 298, p. 315-353. 1995.

BERNICE, M. R. Hatching and Postembryonic Development of *Streptocephalus Dichotomus* Baird (CRUSTACEA: ANOSTRACA). **Hydrobiologia**, v. 40, n.2, p. 251-278. 1972.

BLANCO, A.; PLANAS, M.; MOYANO, F. J. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses Hippocampus guttulatus fed on different live diets. **Aquaculture Research**, n. 47, p. 3558-3569. 2016.

BLIDARIU, F.; GROZEA, A. Increasing the Economical Efficiency and Sustainability of Indoor Fish Farming by Means of Aquaponics – Review. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2. 2011.

BOND, R. M. Report on phyllopod crustacea, including a revision of the Anostraca of the Indian Empire. Mem. Conn. Acad. **Arts and Sci**., v.10, p. 29-52. 1934.

BOGLINO, A.; DARIAS, M. J.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; ÖZCAN, F.; ESTÉVEZ, A.; ANDREE, K. B. HONTORIA, F.; SARASQUETE, C.; GISBERT, E. Commercial products for *Artemia* enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal deformities in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture**, v. 324-325, p. 290-302. 2012.

BOWMAN, T. E.; ABELE, L. G. **Systematics, the fóssil Record and Biogeography**. Editor Dorothy E. Bliss. 1982. Cap. I.

BRITO, D.; BRITO, R.; PEREIRA, G. Supervivencia de *Dendrocephalus spartaenovae* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) alimentado com um cultivo mixto de microalgas. **Zootecnia Tropical**, v. 9, p. 61-68. 2011.

BRUND, G.; MONLEÓN, L. V.; VALLAINC, D.; CARBONI, S. Effects of larval diet and metamorphosis cue on survival and growth of sea urchin post-larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816). Aquaculture, n. 465, p. 265-271. 2016.
CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D,; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO Jr.a, L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 570–577. 2012.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α- e β-quitina. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p. 644-650. 2007.

CARNEIRO, M. D. O. S. **Caracterização biológica e Reprodutiva de** *Dendrocephalus brasiliensis* **(Pesta, 1921) (Crustacea, Brachiopoda)**. Universidade Federal de Pernambuco. Graduação em Engenharia de Pesca (Monografia). Recife. 39p. 2000.

CARNEIRO, R. L.; SILVA, J. A. M.; ALBINATI, R. C. B.; SOCORRO, E. P.; NEVES, A. P. Uso de microcrustáceo (*Dendrocephalus brasiliensis*) na ração para Tucunaré. **Rev. Bras. Saúde Prod. An**., v. 5, n. 1, p. 18-24. 2004.

CAUCHIE, H. M.; MURUGAN, G.; THOMÉ, J. P.; DUMONT, H. J. Intra- and interspecific variation in the chitin content of some anostracans. **Hydrobiologia**, v. 359, p. 223–228. 1997.

CHANTHARASOPHON, K., WARONG, T.; MAPATSA, P.; LEELAVATCHARAMAS, V. H. Potential Probiotic *Bacillus* species from gastro-intestinal tract of Nile Tilapia (*oreochromis niloticus*). **Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 498-505. 2011.

CHITMANAT, C. Fish Immunostimulants. **Songklanakarin Journal Science and Technoogy, Songkhla**, v. 24, n. 4, p. 739-747.2002.

COSTA, A. H.; RIBEIRO, K.; SILVA-JÚNIOR, W. P.; PONTES, C. S. Avaliação de probiótico sobre parâmetros de desempenho de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. **Bol. Inst. Pesca**, v. 42, n. 2, p. 295-305. 2016.

COTTARELLI, V., Notizie sua biologia di un Crostaceo Anostraco: Chirocephalus stagnalis. **Archiv. Zool. It**, v. 51, p.1031-1052. 1966.
CUTTING, S. M. B*acillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220. 2011.

DADAY DE DEES, E. Diagnoses praecursoriae specierum aliquot novarum e familia Branchiopodidae. **Annales de Sciences Naturelles, neuvème série, Zoologie**, v. 7, p.137–150. 1908.

DAS, S., BISWAS, G., GHOSHAL, T.K. Occurrence of pathogenic shrimp viruses in selected wild crab species of sunderban, India. **Indian Journal of Fisheries**, v. 63, n.2 p. 14-146. 2016.

DEXTER, R. W. Further studies on the life history and distribution of *Eubranchipus vernalis* (VERRILL). **Ohio Journal of Science**, v. 46, p.31-44. 1946.

DING, Z.; YAO, Y.; ZHANG, F.; WAN, J.; SUN, M.; LIU, H.; ZHOU, G.; TANG, J.; PAN, J.; XUE, H.; ZHAO, Z. The first detection of white spot syndrome virus in naturally infected cultured Chinese mitten crabs, Eriocheir sinensis in china. **Journal of Virological Methods**, v. 220, p. 49-54. 2015

DOWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ABDEL-DAIM, M. M.; DOAN, H. V. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, p. 907-924. 2019.

DOWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243-251. 2016.

DUMONT, H. J.; CASIER, P.; Manuswamy, N.; Walsche, C. De. Cyst hatching in Anostraca accelerated by retinoic acid, amplified by Calcium Ionophore A23187, and inhibited by Calcium-channel blockers. **Hydrobiologia**, v. 230, p. 1-7. 1992.

EDWARD, L.; LAXMILATHA, P.; SREERAMULU, K.; SURESH KUMAR, P.; MEGARAJAN, S.; GHOSH, S. *Rotifer as a live feed in finfish mariculture.* Aquaculture Spectrum, v. 2, n. 11, p. 33-36. 2019.
EKELEMU, J. K.; AKINYEMI, A. A.; OYELAKIN, O. O.; OLOYEDE, A. R.; AGBASI, V. O. Molecular Characterization and Antibiotic Resistance Profile of Bacteria Associated with *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) From Ebute Iboro Location on Yewa River. **American Journal of Experimental Agriculture, v.** 11, n. 5, p.1-8. 2016.

ELSABAGH, M.; MOHAMED, R.; MOUSTAFA, E. M.; HAMZA, A.; FARRAG, F.; DECAMP, O.; DAWOOD, M. A. O.; ELTHOLTH, M. Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1613-1622. 2018.

FAO. Organização da Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 2016. Disponível em:

< http://www.fao.org/documents/card/en/c/2c8bcf47-2214-4aeb-95b0-62ddef8a982a> Acesso em mar 2018.

FERREIRA, D. R. **Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na Artemia sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho** *Hippocampus reidi*. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (Dissertação de Mestrado). Florianópolis. 68p. 2017.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378. 1989.

GASTALHO, S.; SILVA, G.J.; RAMO, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45. 2014.

GAVIÃO, E. N.; ALVES, J. Q.; HOSHIBA, M. A.; SOUZA, M. A. A. Utilização da branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis* Pesta 1921) na alimentação de peixes ornamentais. 2016. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/aafa/9907e5647dc61959bd79d718495c393dd29e.pdf> Acesso em: 30 Out 2019.

GIARMA, E.; AMANETIDOU, E.; TOUFEXI, A.; TOURAKI, M. Defense systems in developing Artemia franciscana nauplii and their modulation by probiotic bacteria offer protection against a Vibrio anguillarum challenge. **Fish Shellfish Immunol**., v. 66. 2017.

GODONE, R. L. N. **Isolamento de uma Quitinase extraída do cefalotórax do Camarão Marinho** *Litopenaeus schmitti* **(BURKENROAD, 1936): Avaliação de suas atividades antimicrobiana e larvicida**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pós-Graduação em Bioquímica. (Dissertação de mestrado). 101p. 2011.

HAI, N. V. The use of probiotics in aquaculture. **Journal of applied Microbiology**, v. 119, p. 917-935. 2015.

HAMED, I.; OZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in food science & technology**. 2016.

HAMZAA, F.; KUMARA, A. R.; ZINJARDE, S. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus licheniformis* in protecting *Artemia salina* against *Vibrio alginolyticus* and *Pseudomonas gessardii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 335-344. 2018.

HARDY, E. R. D.; CASTRO, J. G. Qualidade nutricional de três espécies de clorofícias cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 39-47. 2000.

HAY, O. P.; HAY, W. P. A contribution to the knowledge of the genus Branchipus. **Amer. Nat**., v. 23, p. 91-95. 1889.

HOSEINIFAR, S. H.; RINGØ, E.; MASOULEH, A. S.; ESTEBAN, M. A. Probiotic, prebiotic and symbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review Reviews in **Aquaculture**, n. 8, p. 89–102. 2016.

HUANG, J.; LI, F.; WU, J.; YANG, F. White spot syndrome virus enters crayfish hematopoietic tissue cells via clathrin-mediated endocytosis. **Virology**, v. 486, p. 35-43. 2015.

INFANTE, C.; ÂNGULO, E.; ZÁRATE, A.; FLOREZ, J. Z.; BARRIOS, F.; ZAPATA, C. Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, v. 3, p. 159-164. 2012.

JAMALI, H.; AHMADIFARD, N.; NOORI, F.; GISBERT, E.; ESTEVEZ, A.; AGH, N. Lecithin-enriched *Artemia* combined with inert diet and its effects on reproduction and digestive enzymes of *Aequidens rivulatus*. **Aquaculture**, v. 511, p. 734253. 2019.
KLOSTERHOFF, M. C. **Diagnósticos de doenças não infecciosas em *Rachycentron canadum* e *Paralichthys orbignyanus* criados em cativeiro**. Universidade Federal do Rio Grande. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (Tese de Doutorado). 92p. 2017.

KUBITZA, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões**. Jundiaí: F. Kubitza. 2003. 229p.

LAKSHMANAN, R.; SOUNDARAPANDIAN, P. Effect of Commercial Probiotics on Large Scale Culture of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 198 – 203. 2008.

LAVENS, P., SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. **FAO Tech. Pap**. 361, 295. 1996.

LI, Q.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; YANG, F. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for artemia at different developmental stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 261-264. 2003.
LI, H.; LIU, J. Effects of defatted *Haematococcus pluvialis* meal (DHPM) supplementation on the growth performance, and the carotenoid content and composition in the rotifer (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture**, v. 505, p. 34-40. 2019.

LIU, X. F.; LI, Y. LI, J. R. CAI, L. Y.; LI, X. X.; CHEN, J. R.; LYU, S. X. Isolation and characterization of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 795-803. 2015.

LODISH, H., BERK, A., KAISER, C. A., KRIEGER, M., BRETSCHER, A., PLOEGGH, H., AMON, A. **Biologia Celular e Molecular**. 7° ed: Ed. Artmed, 2014. 1244p.

LOPES, J. P; SILVA, A. L. N; SANTOS, A. J. G; TENÓRIO, R. A. Branchoneta uma notável contribuição para larvicultura e alevinagem de peixes carnívoros de água doce. **Panorama da Aaquicultura**, v. 8, n. 50, p. 31-34. 1998.

LOPES, J. P.; SILVA, T. A.; GOMES, D. S.; RANGEL, A. C. M. Utilização do anelídeo enquitréia *Enchytraeus albidus*, na alimentação do niquim *Lophiosilurus alexandri* durante a alevinagem inicial. **Rev. Brás. Engª. Pesca**, v. 2, n. 1, p. 156-166. 2007.

LOPES, J. P.; GURGEL, H. C. B.; ARAÚJO, A.; PONTES, C. S. Influência da inoculação de cistos na produção de biomassa de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921 (Crustacea: Anostraca). **Ciênc. Agrotec**., v. 32, n. 2, p. 598-603. 2008.

MARTINS, C. I. M.; PISTRIN, M. G.; ENDE, S. S. W.; EDING, EP. H.; VERRETH, J. A. J. The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 291, p. 65-73. 2009.

MARGALEF, R. La vida en los charcos de agua dulce de Nueva Esparta (Venezuela). **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v. 21, p. 75–110. 1961.

MEDEIROS, J. E. S. **Nutrição em larvicultura**. Universidade Federal de Lavras. Especialização em Aquicultura (Monografia). Lavras, MG. 86p. 2003.

MELLO, H.; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; SHIMADA, M. T.; FILHO, J. R. E.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesq. Vet. Bras**, v. 33, n. 6, p.724-730. 2013.

MOURA, M. A. M.; KUBITZA, F.; CYRINO, J. E. P. Feed training of peackock bass (*Cichla ocellaris*). **Rev. Bras. Biol**., v. 60, n. 4, p. 645-654. 2000.

MUSTHAQ, S.S.; SUDHAKARAN, R.; BALASUBRAMANIAN, G.; HAMEES, A.S.S. Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, Panulirus homarus and Panulirus ornatus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 75-80. 2006.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, p. 2-14. 2010.

NIMRAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, p. 244-258. 2011.

NIMRAT, S.; SUKSAWAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 443–450. 2012.

OIE (World Organization for Animal Health). **OIE-Listed iseases, infections and infestations in force in 2019**. Disponível em:
< https://www.oie.int/animal-health-inthe-world/oie-listed-diseases-2019/> acesso em 29 out 2019.

OLMOS, J.; ACOSTA, M.; MENDOZA, G.; PITONES, V. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. **Archives of Microbiology**, published online. 2019.

PEREIRA, G. Two new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae). **J. Crust. Biol**., v. 4, p. 147-153. 1984.

PEREIRA, G.; BELK, D. Three new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae) from central and South América. **J. Crust. Biol**., v. 7, n. 3, p. 572-580. 1987.

PEREIRA, G; RUIZ, L. A new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae) from Argentina. **Crustaceana**, v. 68, p. 567-574. 1995.

PEREIRA, D. C.; SANTOS-NETO, M. A. Influência do Ácido Ascórbico e dos Íons Ca^{+2} na eclosão de cistos do Anostraca Branconeta (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921). **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 5, n. 3, p. 28-41. 2010.

PESTA, Dr. O. Kritische Revision der Branchipodidensammlung des Wiener naturhistorischen Staatsmuseums. **Kritische Revision der Branchipodi**. 20p. 1921.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied energy**, v. 88, p. 3307-3312. 2011.

PORCHAS-CORNEJO, M.A.; ÁLVAREZ-RUIZ, P.; ÁLVAREZ-TELLO, F.J.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-MORALES, R. Detection of the white spot syndrome virus in zooplankton samples collected off the coast of Sonora, Mexico. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 48-56. 2018.

PORUBCAN, R.S. Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria. Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition. San Juan, Puerto Rico. **World Aquaculture Society**. 16–20p. 1991a.

PORUBCAN, R.S., Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in ponds inoculated with aerobic Bacillus bacteria. Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition. San Juan, Puerto Rico. **World Aquaculture Society**. 16–20p. 1991b.

QUEIROZ, J.F.; BOYD, C.E., Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. **J. World Aquacult. Soc**., v. 29, p. 67–73. 1998.

RABET, N.; THIERY, A. The Neotropical genus Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae) in Brasil (South America), with a description of two new species. **J. Nat. Hist**., v. 30, p. 479-503. 1996.

RABET, N. A new species of Brazilian Dendrocephalus (Anostraca, Thamnocephalidae). **Zootaxa**, v. 1370, p. 49–57. 2006.

REIS, D. B.; ACOSTA, N. G.; ALMANSA, E.; NAVARRO, J. C.; TOCHER, D. R.; ANDRADE, J. P.; SYKES, A. V.; RODRÍGUEZ, C. Comparative study on fatty acid metabolismo of early stages of two crustacean species: *Artemia* sp. Metanauplii and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. C**omparative Biochemistry and physiology**, part B, n. 204, p. 53-60. 2017.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **ScienceDirect**., v. 31, p. 603-632. 2006.

ROCHA, I. P. Os riscos associados às importações de camarões marinhos de países com histórico de doenças virais e bacterianas, como Equador, Tailândia e Vietnã, por exemplo. **Revista da ABCC**, v. 2, p. 6-18. 2017.

RODRIGUES, L.L.; SANT'ANNA, C.L.; TUCCI, A. Chlorophyceae das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, p. 247-264. 2010.

ROGERS, D.C.; CORRÊA-GOMES, J.P.;VIEIRA, F. A new species of Dendrocephalus (Crustacea, Anostraca) from Serra dos Carajás (Pará State, Brasil). **Zootaxa**, v. 3363, p. 52–58. 2012.

ROSA, C. G. **Quitina e Quitosana: Aspectos gerais de obtenção e aplicações**. Universidade Federak de Pelotas. Bacharelado em Química de Alimentos. Trabalho acadêmico como requisito parcial da Disciplina de Seminários. 33p. 2008.

ROTH, L. The battle of the bugs the direct fed microbial concept. **Pig Progress**, v. 16, p. 12-15. 2000.

ROY, D.; BISWAS, B.; ISLAM, H. M. R.; AHMED, MD. S.; RASHEDUZZAMAN; SAROWER, G. Rapid Identification of Enterovirulent *Escherichia coli* Strains using Polymerase Chain Reaction from Shrimp Farms. **Pakistan Journal of biological sciences**, v. 16, p. 1260-1269. 2013.

SANTOS, L. L. S.; CAHÚ, T. B.; TEIXEIRA, D. I. A.; RIBEIRO, K.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; FEITOSA, A. P. S.; CÂMARA, F. R. A.; BEZERRA, R. S. A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921)) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching. **Aquaculture**, v. 512, n. 734350. 2019.

SÁ, M. V. C. **Limnocultura - Limnologia para Aquicultura**. Fortaleza: Ed UFC.2012. 218p.

SHI, L. H.; BALAKRISHNAN, K.; THIAGARAJAH, K.; ISMAIL, N. I. M.; YIN, O. S. Beneficial properties of probiotics. **Tropical life sciences research**, v. 27, n. 2, p. 73-90. 2016.

SILVA, A. E. C. **Sistemas de Produção na piscicultura**. Universidade Federal de Pernambuco. Curso de Graduação em Zootécnia (Monografia). 28p. 2019.

SOUZA, R. M.; SUGAI, J. K.; MOURIÑO, J. L. P.; CERQUEIRA, V. R. *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in the initial development of juvenile fat snook. **Arq. Ciên. Mar**, v. 50, n. 2, p. 72 – 80. 2017.

SRIPUTHORN, K.; SANOAMUANG L. Fairy Shrimp (*Streptocephalus sirindhornae*) as Live Feed Improve Growth and Carotenoid Contents of Giant Freshwater Prawn Macrobrachium rosenbergii. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, p. 138-146. 2010.

STALIN, N.; SRINIVASAN, P. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in palk strait, south east Coast of India. **Biologicals**, v. 44, n. 6. 2016.

STEENFELDT, S. Culture Methods of Pikeperch Early Life Stages. **Biology and Culture of Percid Fishes**, p. 295–312. 2015.

TAKAHASHI, L. S.; DA SILVA, T. V.; FERNANDES, J. B. K.; BILLER, J. D.; GONÇALVES DE SANDRE, L. C. Efeito do tipo de alimento no desempenho produtivo de juvenis de acará-bandeira (*Pterophillum scalare*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n.1, p. 1-8. 2010.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B. Inst. Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335 – 341. 2009.

TESSER, M.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with Artemia nauplii and microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 17, n. 2, p. 47-59. 2005.

TINH, N.T.N.; DIERCKENS, K.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1–12. 2008.

TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI. A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on thephysicochemical characteristcs of chitosan from squid chitin os chitosan. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469. 2000.

VALDEZ, A.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; RICCA, E.; OLMOS, J. First *Litopenaeus vannamei* WSSV 100% oral vaccination protection using CotC: Vp26 fusion protein displayed on *Bacillus subtilis* spores surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 347-35. 2014.

VENKAT, H. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosembergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 501-597. 2004.

VIJAYAN K. K.; STALIN RAJ V.; BALASUBRAMANIAN C. P.; ALAVANDI S.V.; THILLAI SEKHAR V.; SANTIAGO T. C. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, p. 107-111. 2005.

VILLASEÑOR, I. E. L.; CÓRDOVA, A. I. C.; VALLE, F. J. A. **Probiotics in Larvae and Juvenile Whiteleg Shrimp** *Litopenaeus vannamei.* InTech. Open Science. cap. 17. 2012.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. FEMS **Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 404–427. 2006.

WELTNER, W. Branchipus (Chirocephalus) cervicornis, n. sp. aus Südamerika. **Sitzungberichte der Gesellschaft Naturforschender Freund zu Berlin**, v. 3, p. 35–41. 1890.

YANES-ROCA, C.; CUEVAS, M. T.; SÁNCHEZ, L. J.; BORN-TORRIJOS, A. Digestive enzyme activity during larval development of black snook, Centropomus nigrescens. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.49, n. 2, p. 612-624. 2018.

YANG, W.; ZHU, J.; ZHENG, C.; LUKWAMBE, B.; NICHOLAUS, R.; LU, K.; ZHENG, Z. Succession of phytoplankton community during intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation and its effects on cultivation systems. **Aquaculture**. 2019.

YFLAAR, B. Z.; OLIVERA, A. Utilização de náuplios de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) na alimentação de larvas do "camarão cinza" *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 25, n. 2, p. 299-307. 2003.

XUWANG, Y.; SHASHA, Z.; JIAN, H.; PENGFEI L. Effects of food quality and starvation on the optimal foraging behavior of *Daphnia magna* (Cladocera). **Acta Ecologica Sinica**, v. 31, p. 328-333. 2011.

ZHANG, J. S.; DONG, S. L.; DONG, Y. W.; TIAN, X. L.; HOU, C. Q. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod Nitocra sp. **Journal Invertebr. Pathol**., v. 97, p. 33-39. 2008.

ZHANG, J. S.; DONG, S. L.; DONG, Y. W.; TIAN, X. L.; CAO, Y. C.; LI, D. C. Y. Assessment of the role of brine shrimp Artemia in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. **Vet. Res. Commum**, v. 34, p. 25-32. 2010.

ZOUMPOURTIKOUDI, V.; PYRGELIS, N.; CHATZIGRIGORIOU, M.; TASAKIS, R.N.; TOURAKI, M. Interactions among yeast and probiotic bacteria enhance probiotic properties and metabolism offering augmented protection to Artemia franciscana against Vibrio anguillarum. **Microbial Pathogenesis**, v. 125. 2018.