

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

FRANCIS DE MATTOS ALMEIDA

USO DE COPÉPODES NA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE LINGUADO

Paralichthys orbignyanus (Valenciennes, 1842)

E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO COPÉPODE

Acartia tonsa Dana, 1849.

RIO GRANDE, RS.

2006.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

USO DE COPÉPODES NA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE LINGUADO
Paralichthys orbignyanus (Valenciennes, 1842)
E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO COPÉPODE
Acartia tonsa Dana, 1849.

FRANCIS DE MATTOS ALMEIDA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura no Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Rio Grande – RS.

Março de 2006.

ÍNDICE

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1.Introdução.....	01
2.Objetivos.....	07
3.Metodologia.....	08
3.1 Obtenção de copépodes e microalgas.....	08
3.2 Experimento I: Cultivo de larvas de <i>Paralichthys orbignyana</i> alimentadas com <i>Acartia tonsa</i>	09
3.3. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> sobre a produção de ovos de <i>Acartia tonsa</i>	10
3.4. Experimento III: Influência de alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de <i>Acartia tonsa</i>	10
4.Resultados.....	12
4.1. Experimento I: Cultivo de larvas de <i>Paralichthys orbignyana</i> alimentadas com <i>Acartia tonsa</i>	12
4.2. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> sobre a produção de ovos de <i>Acartia tonsa</i>	14
4.3. Experimento III: Influência de alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de <i>Acartia tonsa</i>	15

5.Discussão.....	17
5.1. Experimento I: Cultivo de larvas de <i>Paralichthys orbignyanus</i> alimentadas com <i>Acartia tonsa</i>	17
5.2. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de <i>Thalassiosira fluviatilis</i> sobre a produção de ovos de <i>Acartia tonsa</i>	19
5.3. Experimento III: Influência de alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de <i>Acartia tonsa</i>	21
6.Conclusões.....	22
7.Literatura citada.....	23

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos amigos, familiares e professores que estiveram
sempre ao meu lado, não apenas nas melhores situações,
como também nas mais difíceis...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho, cujo amplo conhecimento, cordialidade e paciência facilitaram o aprendizado e o trabalho de pesquisa. Trazendo crescimento profissional e humano para os seus orientados.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luís André Sampaio, sua experiência, conhecimento e disposição possibilitaram a superação das adversidades e a realização deste trabalho.

Aos amigos, familiares e colegas de laboratório, desejo agradecer sinceramente pelo companheirismo, pelas noites em claro, e por manter tudo aquilo que foi importante para a realização deste trabalho durante a minha ausência. Pelo ombro amigo sempre presente para me apoiar, fisicamente e psicologicamente, naquele período que certamente foi o mais difícil da minha vida... Vocês sempre estiveram dispostos a ajudar nas diversas atividades que foram indispensáveis. Obrigado pela força na manutenção dos cultivos de fitoplâncton e de copépodes, nos inúmeros tanques, baldes e carboys carregados incansavelmente. Pelas (muitas) horas sentados em frente à lupa, contando e separando copépodes ou ovos; ou ao computador, ajudando na parte de estatística, à procura de artigos e pelas intermináveis horas de leitura em busca de erros no meu trabalho. Pela manutenção dos linguadinhos, e principalmente pelos riscos que assumiram ao comprometer os seus próprios afazeres. Por suportar o meu mau humor (em alguns dias) e também por contribuírem fazendo mais que o possível para que eu não me mantivesse muito além dos prazos...

RESUMO

O cultivo experimental do linguado *Paralichthys orbignyanus* tem sido desenvolvido na Estação Marinha de Aquicultura da FURG, Rio Grande – RS, com relativo sucesso. Contudo, elevadas taxas de mortalidade observadas em larviculturas utilizando rotíferos e artêmias como alimentos vivos, têm limitado cultivos em grande escala. Estudos atuais têm mostrado que os copépodes apresentam um bom potencial como alimento vivo alternativo, porém os métodos de cultivo existentes ainda necessitam de aprimoramentos. Portanto, os objetivos deste trabalho foram testar a utilização de copépode *Acartia tonsa* como alimento vivo exclusivo na larvicultura de *P. orbignyanus*, e também contribuir para o aprimoramento do método de cultivo de *A. tonsa*, através da avaliação de diferentes dietas e densidades algais sobre a produção de ovos deste copépode. Larvas de *P. orbignyanus* foram cultivadas num tanque de 50 L (S = 30, T °C = 22) durante 22 dias após a eclosão (dae). Náuplios de *A. tonsa* foram oferecidos como alimento vivo entre o 3° e o 19° “dae” enquanto que copepoditos e adultos foram adicionados a partir do 20° “dae”. A fim de se testar a influência de diferentes densidades algais sobre a produção de ovos de *A. tonsa*, a diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* foi fornecida nas densidades de 0, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 e 80.000 cel mL⁻¹. Para se avaliar a influência de diferentes dietas sobre a produção de ovos, foram utilizadas duas microalgas, *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros mulleri*, e uma dieta comercial inerte. Os resultados mostraram que as larvas de linguado se alimentaram efetivamente de *A. tonsa* completando a metamorfose entre o 19° e o 22° dae. O comprimento padrão (mm) das larvas no 7° dae foi de 2,98 ± 0,20, 4,77 ± 0,24 no 14° dae e 4,90 ± 0,42 no 22° dae. A produção de ovos de *A. tonsa* foi diretamente influenciada pelo aumento da concentração de *T. fluviatilis*, sendo o maior valor obtido na concentração de 80.000 cel mL⁻¹ (~ 60 ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹). Com relação ao teste de produção de ovos sob diferentes dietas, foi observado que tanto o alimento inerte como a microalga *N. oculata* foram ineficazes, proporcionando uma produção de ovos muito baixa (~ 1 - 2 ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹). Já a dieta composta pela diatomácea *C. mulleri*, proporcionou uma produção de 22 ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹, representando uma boa alternativa alimentar para o cultivo de *A. tonsa*. Além disso, o seu tamanho (~ 7 µm) permite a alimentação tanto de náuplios como de adultos, facilitando o cultivo deste copépode.

ABSTRACT

The experimental rearing of the flounder *Paralichthys orbignyanus* has been carried out with relative success at the Estação Marinha de Aqüicultura - FURG, Rio Grande, RS, Brazil. Nevertheless, its large scale cultivation is still limited by frequent high mortality rates observed in larvicultures using rotifers and *Artemia* as live food. Recent studies have shown that copepods can be a good alternative as live food for fish larvae. However the existing copepod culture techniques need many improvements towards the development of reliable production systems. The objectives of this study were to evaluate the performance of *P. orbignyanus* larvae from the first feeding until the metamorphosis, under a diet composed by the copepod *Acartia tonsa* and also; to contribute for the improvement of copepods culture system by testing the influence of different diets and algal densities on the copepods egg production rates. *P. orbignyanus* larvae were reared in a 50 L tank during 22 days after hatching (dah) (S = 30, T = 22 °C). *A. tonsa* nauplii were offered through the 3° dah to the 19° dah, and after this period, copepodits and adults were included in the larval diet. Regarding the trial of the influence of different algal densities on the copepods egg production, the diatom *Thalassiosira fluviatilis* was offered at the following concentrations: 0, 5 000, 10 000, 20 000, 40 000 and 80 000 cels mL⁻¹. To evaluate the influence of different diets on the egg production of *A. tonsa*, the microalgae *Nannochloropsis occulata* and *Chaetoceros mulleri*, and an inert diet were tested. The results showed that the flounder larvae were able to feed effectively on *A. tonsa*, completing the metamorphosis between the 19° and the 22° dah. The larval standard length (mm) in the 7° dah was 2.98 ± 0.20 , 4.77 ± 0.24 in the 14° dah, and 4.90 ± 0.42 in the 22° dah. The density of the diatom *T. fluviatilis* had a high influence on *A. tonsa* egg production, reaching a maximum value at 80 000 cels mL⁻¹ (~ 60 eggs female⁻¹ 24 h⁻¹). Concerning the different diets tested, the copepods fed the artificial diet and *N. occulata* exhibited a very low egg production rate (~ 1 - 2 eggs female⁻¹ 24 h⁻¹). On the other hand, the copepods fed on the diatom *C. mulleri* showed a relatively high egg production (22 eggs female⁻¹ 24 h⁻¹); suggesting that this microalga represents a good choice for the cultivation of *A. tonsa*. Moreover, the size of this diatom (~ 7 µm) allows its application on the feeding of both nauplii and adults, simplifying the copepods culture system.

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura é uma prática em pleno desenvolvimento ao nível mundial, podendo representar uma fonte de alimento e renda para a humanidade. Com um crescimento de 18,1% entre os anos de 2000 e 2002, o Brasil foi o quarto país que mais cresceu nesta atividade durante este período (FAO 2004).

Os principais cultivos têm sido realizados com peixes de água doce como tilápias (*Oreochromis* spp.), carpas (*Ciprinus* sp., *Aristichthy nobilis* e *Hypophthalmichthys molitrix*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*). O cultivo de camarões tem sido feito majoritariamente com *Litopenaeus vannamei* e o cultivo de moluscos com mexilhões (*Perna perna*) e ostras (*Crassostrea gigas* e *Crassostrea rhizophorae*) (FAO 2001).

Nos últimos anos tem se tornado crescente o interesse na realização de pesquisas com espécies nativas, que avaliem o potencial de cultivo e os respectivos métodos utilizáveis. Isto evita a introdução de espécies exóticas, que podem sair do controle do cativeiro e invadir o ambiente, causando danos imprevisíveis à fauna e à flora nativas (Naylor *et al.* 2001).

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) habita baixas profundidades de zonas costeiras (Carneiro 1995, Haimovici *et al.* 1996). Distribui-se pela costa atlântica da América do Sul, entre o Rio de Janeiro - Brasil (22° 50' S) e o golfo de San Matias - Argentina (41° 30' S) habitando também as áreas estuarinas existentes nesta faixa latitudinal, como a Lagoa dos Patos (Brasil) e Mar del Plata (Uruguai/Argentina) (Díaz de Astarloa & Munroe 1998, Díaz de Astarloa 2002).

Este peixe possui a carne de alta qualidade e atinge um elevado valor de mercado, representando um importante recurso pesqueiro no sul do Brasil, (Cerqueira *et al.* 1997, Díaz de Astarloa & Munroe 1998, Díaz de Astarloa 2002). No sul Brasil, a soma da pesca de *P. orbignyanus* e *Paralichthys patagonicus* atingiu 500 toneladas anuais no final da década de 70 e início dos anos 80. Após ter alcançado o pico de 1.892 toneladas no final da década de 80, diminuiu consideravelmente, ficando abaixo de 400 toneladas em 1999 (Díaz de Astarloa 2002).

P. orbignyanus apresenta um grande potencial para o cultivo, uma vez que tolera alguns fatores de estresse relacionados com o cativeiro. Este peixe caracteriza-se pela

resistência a amplas faixas de salinidade (Wasielesky *et al.* 1995), compostos nitrogenados (Bianchini *et al.* 1996) e estresse ácido (Wasielesky *et al.* 1997). Cerqueira *et al.* (1997) obtiveram sucesso na indução à desova e ressaltaram a importância de estudos sobre a alimentação das larvas de *Paralichthys orbignyanus*, uma vez que foi observada grande mortalidade das larvas obtidas que foram alimentadas com rotíferos (sem seleção de tamanho).

A larvicultura representa uma das fases críticas para a criação de muitas espécies de peixes (Sargent *et al.* 1997). Sob esta perspectiva, são necessárias pesquisas que enfoquem esta fase do desenvolvimento de *P. orbignyanus*. Com relação à temperatura em que as larvas devem ser cultivadas, Okamoto (2004) sugere que a melhor temperatura é de 23 °C, pois a maior tolerância à inanição e sucesso da metamorfose infere mais qualidade às larvas. Quanto ao fotoperíodo, Louzada (2004) sugere que até os 20 dias após a eclosão, as larvas devem permanecer em 24 h de luz para favorecer a alimentação, uma vez que os linguados são predadores visuais, após este período, as larvas devem ser mantidas em 18 h de luz por dia.

Um dos fatores decisivos no sucesso da criação das larvas está associado com o desenvolvimento de uma dieta que seja capaz de suprir as necessidades nutricionais do animal em questão. Para os peixes marinhos em geral, o alimento deve ser rico em ácidos graxos altamente insaturados da família ômega três (HUFA n-3). Entre estes, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são considerados essenciais às larvas de peixes marinhos, e devem estar presentes na dieta para garantir o seu crescimento e desenvolvimento (Evjelmo & Olsen 1997, Rainuzzo *et al.* 1997, Shields *et al.* 1999, Takeuchi 2001).

Os principais organismos utilizados como alimento vivo na larvicultura de peixes marinhos são os rotíferos e artêmias (Cho *et al.* 1985, Lubzens *et al.* 2001, Takeuchi 2001, Mckinnon *et al.* 2003). Provavelmente isto se relacione à facilidade de produção da biomassa a ser utilizada como alimento. Por outro lado, estes animais não suprem todas as necessidades nutricionais das larvas, sendo necessário o seu enriquecimento com os ácidos graxos essenciais (Lubzens *et al.* 2001, Støttrup 2000, Bell *et al.* 2003). O perfil nutricional dos rotíferos depende da qualidade do seu alimento, portanto o enriquecimento com microalgas e/ou emulsões comerciais ricas em ácidos graxos essenciais é realizado para melhorar a qualidade desse alimento vivo (Barclay & Zeller

1996, Dhert *et al.* 2001, Lubzens *et al.* 2001). Em relação ao enriquecimento das artêmias, a capacidade que estes animais têm em catabolizar DHA é um dos fatores que dificultam este procedimento (McEvoy *et al.* 1995, Sorgeloos *et al.* 2001). Além disso, as artêmias tendem a armazenar os ácidos graxos na forma de triglicerídeos, entretanto, a forma de fosfolipídeos é mais importante na alimentação de larvas de peixes marinhos, uma vez que é utilizada diretamente na formação/manutenção de membranas celulares, principalmente nos tecidos nervosos (Sargent *et al.* 1997).

O uso dos rotíferos como alimento vivo permitiu o desenvolvimento do cultivo de diversos peixes ao redor do mundo (Cho *et al.* 1985, Fukusho 1991, Lee & Kelley 1991, Kelley & Lee 1991, Lubzens *et al.* 2001). Porém, a lóricas e os ovos amícticos não são facilmente digeridos pelas larvas (Lubzens *et al.* 1989).

Em um estudo sobre a primeira alimentação do “john’s snapper” *Lutjanus johnii*, Schipp *et al.* (1999) observaram que os rotíferos foram defecados vivos e as larvas apresentaram mortalidade total em apenas cinco dias de cultivo. Em relação ao turbot, *Psetta maxima*, quando rotíferos são utilizados na alimentação das larvas, a sobrevivência é relativamente baixa, normalmente entre 10 e 35 % no 25º dia após a eclosão. A mortalidade típica ocorre no período entre o 6º e o 8º dia após a eclosão, sendo esse o tempo máximo em que larvas em inanição podem sobreviver. O fato das larvas não se alimentarem pode ser atribuído à inadequação do alimento e/ou problemas com bactérias no alimento vivo (Ruyet *et al.* 1991).

Com relação ao halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, as larvas alimentadas com copépodes apresentaram taxas de sobrevivência significativamente maiores e, um melhor padrão de pigmentação que as larvas alimentadas com artêmias. Mais de 40 % das larvas alimentadas com artêmias foram classificadas como albinas, enquanto que entre as larvas alimentadas com copépodes nenhuma foi albina, e 55 % apresentaram a pigmentação correta em ambos os lados do corpo (Shields *et al.* 1999).

Burke *et al.* (1999) cultivaram *Paralichthys dentatus* utilizando rotíferos durante a larvicultura, e observaram uma alta mortalidade durante os quatro dias subsequentes à abertura da boca. Estes autores relacionaram essa mortalidade com problemas no desenvolvimento da mandíbula e à inanição causada pela inadequação do alimento vivo ao tamanho da boca das larvas.

Quanto às larvas de bacalhau, *Gadus morhua*, as que são alimentadas com rotíferos nos cultivos intensivos têm taxas de crescimento menores e maior frequência de deformidades. Em contraste àquelas alimentadas com copépodes em cultivos extensivos e semi-extensivos (Hamre 2006).

O cultivo de *Paralichthys orbignyanus* realizado na Estação Marinha de Aquicultura da FURG (EMA) apresenta a larvicultura dividida em duas fases utilizando alimento vivo. Logo após o término das reservas vitelínicas (3º dia de vida), são utilizados rotíferos. Quando a larva apresenta em torno de 15 dias de vida (5 - 7 mm), gradualmente são introduzidos náuplios de artêmia, os quais são utilizados até sua substituição por dietas inertes após completarem a metamorfose (10 - 15 mm) (Bianchini *et al.* 2005).

Sob o ponto de vista nutricional, uma dieta à base de rotíferos e artêmias pode ser totalmente substituída, ou apenas complementada com o uso de copépodes. Uma vez que em relação ao perfil de ácidos graxos, a composição nutricional destes animais supre as necessidades das larvas de peixes (Sargent *et al.* 1997, Mckinnon *et al.* 2003). Segundo Bell *et al.* (2003), os copépodes são considerados o melhor alimento para as larvas de linguados. E também são utilizados com sucesso na larvicultura de outras espécies de peixes, como *Lutjanus argentimaculatus* (Doi & Singhagraiwan 1993), *Lutjanus johnii* (Schipp *et al.* 1999), *Glaucosoma hebraicum* e *Chrysophrys auratus* (Payne *et al.* 2001).

O bom desempenho dos copépodes como alimento vivo, pode estar relacionado à sua capacidade de incorporar da sua dieta fitoplanctônica os ácidos graxos essenciais para as larvas de peixes (Sargent *et al.* 1997, Bell *et al.* 2003). Quando comparados com as artêmias, os copépodes são mais facilmente digeridos (Luizi *et al.* 1999), isto reflete o que ocorre no ambiente natural, no qual os copépodes são as principais presas de larvas de peixes (Hunter, 1981).

Com relação ao tamanho do alimento vivo, os copépodes *Acartia tonsa* apresentam náuplios com aproximadamente 100 µm de comprimento, copepoditos intermediários com 500 µm e adultos com 900 µm (Schipp *et al.* 1999). O reduzido tamanho dos náuplios é uma vantagem em relação aos rotíferos, já que a boca das larvas durante a primeira alimentação pode ser muito pequena e tornar-se um empecilho para o desenvolvimento do cultivo. Como o caso de algumas espécies de peixes pertencentes

às famílias Lutjanidae (Schipp *et al.* 1999) e Serranidae (Doi *et al.* 1997, Marte 2003), cujas larvas apresentam a boca com tamanho reduzido.

No caso do *Paralichthys orbignyanus*, a boca é relativamente pequena durante a primeira alimentação (Louzada 2004), o que dificulta a sua criação utilizando rotíferos, já que nem todas as linhagens são pequenas. Em contrapartida, os diferentes tamanhos dos náuplios, copepoditos e adultos de copépodes, permitem o uso de apenas uma espécie de alimento vivo durante as diferentes fases alimentares das larvas de peixes marinhos.

A utilização de copépodes como alimento vivo é uma alternativa viável para o desenvolvimento da larvicultura de peixes marinhos (Payne *et al.* 2001, Bell *et al.* 2003, McKinnon *et al.* 2003), porém, o seu uso ainda é bastante restrito. Atualmente, a maioria dos copépodes utilizados em larviculturas é proveniente de viveiros (cultivos semi-intensivos), ou diretamente da natureza (Doi & Singhagraiwan 1993, Støttrup 2000).

Entretanto, estas formas de obtenção do alimento vivo podem prejudicar a larvicultura, uma vez que não existe o controle sobre as espécies do zooplâncton introduzidas nos cultivos. Deste modo, não existe a seleção de um perfil nutricional, e tampouco de uma faixa de tamanho ideal do alimento vivo. Existe também o risco de introdução de vetores de doenças e predadores (Knuckey *et al.* 2005). Além disso, a disponibilidade de copépodes no ambiente é variável, comprometendo o fornecimento de alimento vivo aos organismos cultivados.

Sob esta perspectiva, o cultivo intensivo de copépodes é uma fonte segura de alimento vivo, representando uma alternativa à aquisição direta do habitat, sem problemas com sazonalidade, com um perfil nutricional melhor definido e apresentando baixo risco de contaminação (Støttrup 2000, Knuckey *et al.* 2005).

O cultivo intensivo de copépodes ainda está em processo de desenvolvimento, permanecendo em escala laboratorial para a realização de pesquisas que normalmente enfocam a nutrição, reprodução e os aspectos fisiológicos dos copépodes (Støttrup 2000). Para o suprimento de copépodes nas larviculturas, é necessário o uso de sistemas de cultivo altamente produtivos, sendo muito importante separar periodicamente os náuplios produzidos nos sistemas intensivos (Payne & Rippingale 2001). Esta triagem mantém as presas com tamanho padronizado e, evita a diminuição na produção de

copépodes devido ao canibalismo (Ara 2001). Além disso, a seleção dos ovos e/ou náuplios garante que o fitoplâncton destinado aos reprodutores não seja ingerido pelos copépodes juvenis, o que diminuiria a produção do sistema (Payne & Rippingale 2001).

Entre os métodos de cultivo existentes para *Acartia tonsa*, o desenvolvido por Bersano (2003) consiste em um tanque cilindro-cônico de 500 L equipado com um sistema coletor de ovos, o qual permite a coleta de ovos e náuplios produzidos num período de 24 h. Este sistema encontra-se em fase de desenvolvimento, mas tem se mostrado muito promissor com uma produção média de 1,780 náuplios L⁻¹ dia⁻¹. Neste cultivo os adultos são alimentados com a microalga *Thalassiosira fluviatilis* numa densidade média de variando de 10 a 20 x 10³ células mL⁻¹. Até então, o parâmetro utilizado para a determinação da densidade de *T. fluviatilis* oferecida aos copépodes tem sido baseado na quantidade ótima em termos de carbono de acordo com Kiørboe *et al.* (1985). Porém, estudos mais detalhados são necessários para se quantificar exatamente qual a melhor densidade algal para este sistema de cultivo.

Embora o método de Bersano (2003) seja eficiente, é de suma importância que o mesmo seja aprimorado, principalmente com relação à avaliação de novas dietas que possam otimizar o cultivo de *A. tonsa*. Neste sentido, devem ser testados fatores como a quantidade e a composição do alimento a ser utilizado, uma vez que a produção de ovos e o perfil nutricional dos copépodes são estreitamente relacionados com o alimento disponibilizado. Portanto, é importante quantificar e determinar a composição da dieta, pois as diversas espécies de microalgas que podem ser empregadas no cultivo de copépodes possuem características distintas. Além disso, os copépodes são capazes de selecionar o alimento de acordo com o seu estado e/ou características nutricionais (Cowles *et al.* 1988).

Uma das maiores dificuldades é a produção de fitoplâncton de alta qualidade (em fase exponencial de crescimento da população, livre de contaminação, etc.) e em grandes volumes (Schipp *et al.* 1999). Desta forma, o ideal seria a substituição das microalgas cultivadas por alimentos comerciais inertes. Estes alimentos devem manter o perfil nutricional dos copépodes adequado às exigências das larvas de peixes cultivadas. Além disso, é importante que sejam atrativos aos diferentes estádios de desenvolvimento dos copépodes e que proporcionem elevadas taxas de produção de ovos e crescimento.

O principal objetivo deste trabalho é levantar informações a respeito do cultivo das larvas *Paralichthys orbignyanus* com uma dieta à base de *Acartia tonsa*, pois ainda não existem registros do cultivo desta espécie de linguado utilizando copépodes como alimento vivo. Uma vez que ambas as espécies são nativas, este estudo vislumbra a diminuição do cultivo de espécies exóticas à região sul do Brasil para a realização da larvicultura deste peixe. A adoção de apenas uma espécie de alimento vivo diminuiria a necessidade de diversos cultivos simultâneos, certamente contribuindo para a redução dos gastos e dos riscos de quebra da produção.

Por outro lado, a otimização do método de cultivo de *A. tonsa* por meio da determinação de novas dietas é de extrema importância, pois a melhoria do sistema de cultivo intensivo representa o suprimento confiável de copépodes para a larvicultura de *P. orbignyanus* e outras espécies cultiváveis. Além disso, *A. tonsa* é considerada cosmopolita, habitando as faixas tropical e subtropical dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Bradford-Grieve *et al.* 1999). Assim, o cultivo deste copépode permitiria a sua utilização como alimento vivo em larviculturas realizadas em diferentes países ao redor do planeta.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a possibilidade de alimentação de larvas de *Paralichthys orbignyanus* utilizando copépodes como único alimento até a metamorfose. Contribuir para a otimização do método de cultivo intensivo do copépode *Acartia tonsa*, mediante o teste da influência de diferentes dietas sobre a produção de ovos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o copépode *Acartia tonsa* como alimento vivo exclusivo na larvicultura de *Paralichthys orbignyanus*, verificando se as larvas deste peixe conseguem atingir a metamorfose.

- Avaliar a influência de diferentes densidades (células ml^{-1}) da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* sobre a produção de ovos do copépode *Acartia tonsa*.
- Testar o uso do alimento inerte “Culture Selco 3000[®]” e de duas dietas monoalgais, compostas por *Chaetoceros mulleri* e *Nannochloropsis occulata*, na produção de ovos e pelotas fecais do copépode *Acartia tonsa*.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção de copépodes e microalgas

Os copépodes (*Acartia tonsa*) foram coletados no verão de 2004 em arrastos de zooplâncton com malha de 150 μm na Praia do Cassino – Rio Grande, RS, separados com o auxílio de pipetas Pasteur sob um microscópio estereoscópico e, cultivados segundo o método desenvolvido por Bersano (2003), na EMA. O sistema consiste no cultivo intensivo dos copépodes em um tanque cilindro cônico de 500 L (tanque de reprodutores). Conectado a este tanque há um coletor de ovos alimentado pelo sistema de aeração “airlift”, que permite a retirada dos ovos e náuplios produzidos a cada 12 ou 24 h. A microalga *Thalassiosira fluviatilis* (20.000 células mL^{-1}) é utilizada para a alimentação dos adultos, enquanto que *Isochrysis galbana* (50.000 células mL^{-1}) é fornecida para os náuplios.

As microalgas utilizadas nos experimentos (*T. fluviatilis*, *Chaetoceros mulleri*, *Nannochloropsis occulata*, *I. galbana*) foram cultivadas com o uso do meio de cultura f/2 modificado (Guillard & Ryther 1962). O cultivo foi realizado mediante repicagens sucessivas de culturas de microalgas maduras (três dias de idade), inoculando-as em frascos de maior volume contendo meio de cultura esterilizado. Em frascos com volume menor que 2 L, o cultivo foi realizado sem aeração, sendo agitados uma vez ao dia. Entretanto, em volumes maiores foi utilizada aeração para manter as células das microalgas na coluna de água. O maior volume utilizado foi de 500 L para *T. fluviatilis* e 250 L para *I. galbana*, que foram utilizadas tanto na rotina de alimentação dos copépodes quanto na realização dos experimentos. *C. mulleri* e *N. occulata* foram

repicadas até o volume máximo de 500 mL exclusivamente para a realização dos experimentos.

3.2. Experimento I: Cultivo de larvas *Paralichthys orbignyanus* alimentadas com *Acartia tonsa*.

Náuplios de *Acartia tonsa* foram utilizados na primeira alimentação de larvas de linguados em substituição aos rotíferos e como segundo item alimentar, foram usados copépodes adultos em substituição das artêmias. Durante o cultivo a temperatura média da água foi de 22,1 °C ($\pm 1,27$), e a salinidade 30.

No dia três de abril de 2005, foi realizada a desova induzida de uma fêmea de linguado que foi fertilizada com o sêmen proveniente de quatro machos. O peso dos óvulos foi de 21,1 g e a taxa de segmentação foi de 87 %. Parte dos ovos fertilizados foi colocada em um tanque cilindro-cônico com volume de 50 L para a eclosão e criação das larvas a serem alimentadas com copépodes. A partir do terceiro dia após a eclosão, a água foi renovada diariamente em 50 % com o auxílio de um sifão. Náuplios de *A. tonsa* (20 indivíduos mL⁻¹), *Isochrysis galbana* (50.000 células mL⁻¹) e *Nannochloropsis occulata* (500.000 células mL⁻¹) foram adicionados logo após a renovação da água. Esta rotina foi mantida até o 19º dia após a eclosão, embora no 13º e 14º utilizou-se a metade da densidade desejada de náuplios, devido a problemas com o cultivo de copépodes. A partir do 20º dia após a eclosão, foram introduzidos adultos e copepoditos de *A. tonsa* (aproximadamente oito indivíduos mL⁻¹), com a inclusão de *Thalassiosira fluviatilis* (2.000 células mL⁻¹) na água do cultivo. As larvas foram monitoradas até 22 dias após a eclosão, durante todo o período foi utilizada aeração muito suave, com o auxílio de pedra porosa.

Para monitorar o crescimento das larvas de linguado cultivadas exclusivamente com *A. tonsa*, foram realizadas medidas de comprimento total e comprimento padrão no 7º, 14º e 21º dias após a eclosão. Após as biometrias as larvas foram devolvidas no tanque.

3.3. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de *Thalassiosira fluviatilis* sobre a produção de ovos de *Acartia tonsa*.

Dezenas de copépodes adultos foram isolados com o uso de uma pipeta tipo Pasteur sob microscópio estereoscópico. Posteriormente foram acondicionados oito copépodes (dois machos e seis fêmeas) para cada frasco de 300 mL que formavam as unidades experimentais. Foram feitas três repetições para cada tratamento, totalizando 18 unidades experimentais.

As densidades de células de *Thalassiosira fluviatilis* utilizadas nos tratamentos foram: 0 cel mL⁻¹ (controle), 5.000 cel mL⁻¹ (tratamento 1), 10.000 cel mL⁻¹ (tratamento 2), 20.000 cel mL⁻¹ (tratamento 3), 40.000 cel mL⁻¹ (tratamento 4) e 80.000 cel mL⁻¹ (tratamento 5). Os copépodes foram submetidos a 24 h de aclimação aos tratamentos, tempo considerado suficiente para os animais atingirem o equilíbrio energético (Kjørboe *et al.* 1985). Terminado o período de aclimação, os copépodes foram retidos com malha de 150 µm para a retirada dos ovos e pelotas fecais. Efetuou-se a troca da água e iniciou-se o período experimental (24 h). Durante as 48 h compreendidas pela aclimação e o período experimental, os frascos foram mantidos em uma câmara de germinação a 23 °C (± 2 °C) e com o fotoperíodo ajustado em 12 h claro e 12 h escuro, sendo agitados suavemente em intervalos de 3 h para a ressuspensão das algas depositadas no fundo. A água do mar utilizada no experimento foi filtrada em 1 µm e apresentava salinidade 31. Terminado o experimento, os ovos produzidos foram retidos em malha de 45 µm e fixados em solução de formaldeído a 4 % para posterior contagem.

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA uma via seguida do teste de Tukey, para verificar a existência de diferenças significativas na produção de ovos entre os diferentes tratamentos.

3.4. Experimento III: Influência de alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de *Acartia tonsa*.

As dietas oferecidas aos copépodes foram constituídas por “Culture Selco 3000[®]”, *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros mulleri* em quantidades equivalentes de

volume. Para tal, as partículas de “Culture Selco 3000[®]” e das duas microalgas usadas foram medidas sob um microscópio óptico. Com o formato de uma esfera, as partículas de alimento inerte e as células de *Nannochloropsis oculata* tiveram o diâmetro medido. Com relação às células de *Chaetoceros mulleri*, que possuem a forma de um prisma sobre base elíptica, foram medidos o comprimento e largura em vista valvar e a altura da célula em vista pleural. Os dados obtidos com as medidas foram aplicados à respectiva forma geométrica para a determinação do seu volume de acordo com Hillebrand *et al.* (1999).

As unidades experimentais utilizadas foram frascos de vidro com volume de 300 mL. Em cada um foram colocados nove copépodes (três machos e seis fêmeas). Assim como no experimento anterior, foram utilizadas 24 h para aclimação, seguidas de 24 h de período experimental. A aclimação foi realizada em beakers de 600 mL contendo os tratamentos e um lote de copépodes com aproximadamente 15 dias de vida. Após o período de aclimação, os copépodes de cada tratamento foram separados como auxílio de um microscópio estereoscópico e distribuídos nas unidades experimentais. Foram feitas três repetições dos respectivos tratamentos aclimatados. A água utilizada foi filtrada a 1 μm , apresentava salinidade 30. Todos os frascos foram transferidos para uma câmara de germinação com temperatura mantida a 21 °C (± 2 °C) e fotoperíodo em 12 h claro e 12 h escuro.

As microalgas utilizadas estavam no terceiro dia de cultivo no início do período de aclimação. O alimento inerte foi preparado 15 minutos antes do uso, conforme as recomendações do Prof. Dr. Luís André Sampaio. A determinação das densidades de microalgas e de partículas do alimento inerte foi embasada no cálculo do volume equivalente (Tabela 1). O padrão utilizado para o cálculo de equivalência de volume foi a microalga *Thalassiosira fluviatilis* na densidade de 20.000 células mL⁻¹, conforme proposto por Bersano (2003), baseando-se na quantidade de carbono necessária para que *Acartia tonsa* apresente a máxima produção de ovos (Kiorboe *et al.* 1985).

Após o período experimental o conteúdo dos frascos foi filtrado em malha de 45 μm e os ovos e pelotas fecais retidos foram fixados em solução de formaldeído a 4 % para posterior contagem. Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA uma via seguida do Teste de Tukey, para verificar diferenças significativas na produção de ovos entre os grupos testados.

Tabela 1 – Dimensões, forma geométrica associada, volume e densidade de células ou partículas utilizado para equivaler à concentração de 20000 células mL⁻¹ de *Thalassiosira fluviatilis* (biovolume celular: 1053,14µm³). A: comprimento (vista valvar); B: largura (vista valvar); C: altura (vista pleural); D= Diâmetro

	Culture Selco 3000®	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Chaetoceros mulleri</i>
Dimensões (µm)	D: 4,68	D: 4,46	A: 7,29; B: 4,96; C: 5,08
Forma geométrica	esfera	esfera	prisma sobre base elíptica
Volume (µm ³)	54	46	144
Equivalência (células mL ⁻¹)	392000	454000	146000

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I: Cultivo de larvas de *Paralichthys orbignyanus* alimentadas com *Acartia tonsa*.

Foi constatado que as larvas de *Paralichthys orbignyanus* são capazes de ingerir náuplios de copépodes na primeira alimentação e copepoditos/adultos a partir do 20º dia após a eclosão. No 19º dia após a eclosão, algumas larvas apresentavam o comportamento demersal característico da metamorfose e, no 22º dia após a eclosão todas as larvas já estavam assentadas (figura 1).

Em geral, o crescimento em comprimento das larvas de linguado foi maior durante o período compreendido entre o 7º e o 14º dia após a eclosão, do que durante o tempo entre o 14º e o 22º dia após eclosão. As biometrias mostraram que entre o 7º e o 14º dia após a eclosão houve um incremento no comprimento total de 80,58 % e, entre o 14º e o 22º dia após a eclosão o comprimento total aumentou em 20 %. Em relação ao comprimento padrão, entre o 7º e o 14º dia após a eclosão ocorreu um aumento de 60 % e entre o 14º e o 22º dia após a eclosão o incremento no comprimento padrão foi de 2,72 % (Tabela 2).

A relação entre o comprimento total e o padrão cresceu 12,59 % entre o 7º e o 14º dia após a eclosão, e 16 % entre o 14º e o 22º dia após a eclosão (Tabela 2). O aumento

nos valores desta relação ao longo dos 22 dias de vida das larvas demonstra o crescimento da cauda, uma vez que este índice expressa a distância entre o comprimento total e o comprimento padrão. Ao longo da larvicultura não foram observadas deformações na coluna vertebral nem albinismo nas larvas.

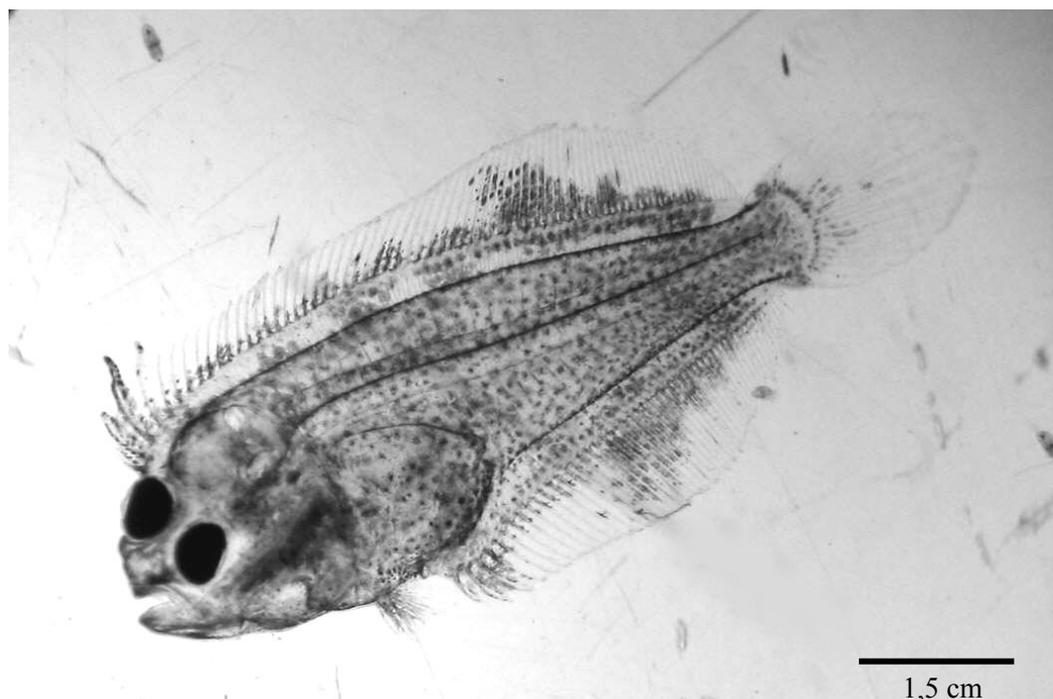


Figura 1 - Larva de *Paralichthys orbignyanus* alimentada exclusivamente com *Acartia tonsa* no 22º dia após a eclosão.

Tabela 2 – Crescimento das larvas de *Paralichthys orbignyanus* alimentadas exclusivamente com *Acartia tonsa* com 7, 14 e 22 dias após a eclosão (dae). Medidas morfométricas: Comprimento total (CT); Comprimento padrão (CP); Razão entre o comprimento total e o padrão (CT/CP).

	7 dae	14 dae	22 dae
CT (mm)	3,76 ($\pm 0,20$)	6,79 ($\pm 0,35$)	8,16 ($\pm 0,95$)
CP (mm)	2,98 ($\pm 0,20$)	4,77 ($\pm 0,24$)	4,90 ($\pm 0,42$)
CT/CP	1,27	1,43	1,66

4.2. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de *Thalassiosira fluviatilis* sobre a produção de ovos de *Acartia tonsa*.

Durante este experimento, foi constatado que a produção de ovos por *Acartia tonsa* foi fortemente influenciada pela disponibilidade de alimento. *A. tonsa* foi praticamente incapaz de produzir ovos na ausência de alimento (inanição). A produção de ovos aumentou gradativamente de forma significativa com o aumento da oferta de alimento (ANOVA, $p < 0.01$), no caso a microalga *Thalassiosira fluviatilis*.

Na densidade inicial de 5.000 células mL^{-1} (tratamento 1), a produção de ovos foi aproximadamente 14 vezes maior (estatisticamente significativo) que no grupo controle (inanição). O segundo tratamento (10.000 células mL^{-1}) foi estatisticamente semelhante ao primeiro tratamento, com uma produção de ovos 1,6 vezes maior, e ao terceiro tratamento (20.000 células mL^{-1}) que apresentou uma produção 1,3 vezes maior que o segundo. O quarto tratamento (40.000 células mL^{-1}) foi significativamente superior ao terceiro tratamento, com um incremento de 1,5 vezes na produção. Em relação ao quinto tratamento (80.000 células mL^{-1}), a produção de ovos foi 1,6 vezes maior que o quarto tratamento (estatisticamente significativo), atingindo a maior produção de ovos entre todos os tratamentos (Figura 2).

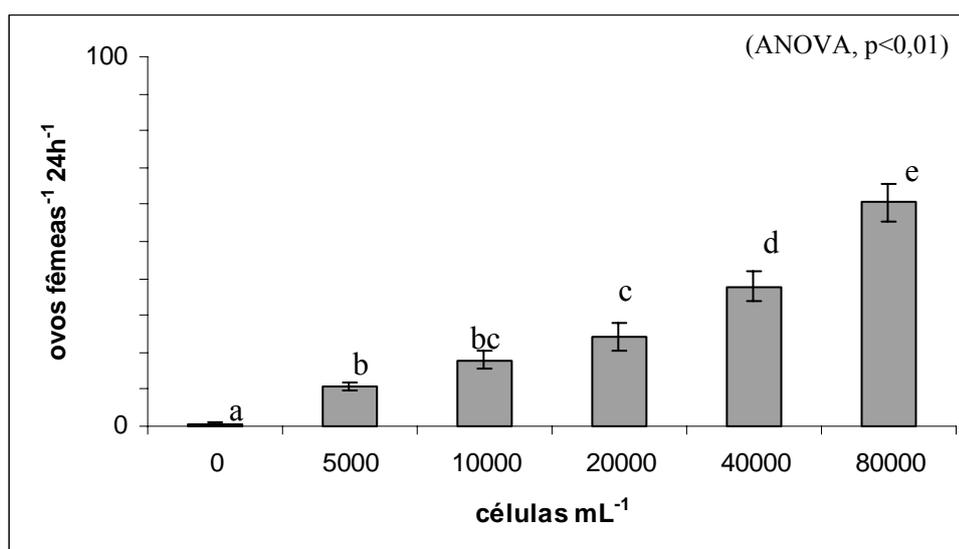


Figura 2 - Valores médios e desvios padrão da produção de ovos por *Acartia tonsa* durante o período de 24h. Os copépodes foram alimentados com diferentes densidades de *Thalassiosira fluviatilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas verificadas por Anova uma via seguida do teste de Tukey.

4.3. Experimento III: Influência de alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de *Acartia tonsa*.

A produção de ovos e pelotas fecais por *Acartia tonsa* foi influenciada pelo tipo de alimento fornecido. Neste experimento, a produção de ovos nos copépodes alimentados com *Chaetoceros mulleri* foi significativamente superior (ANOVA, $p < 0.01$) aos outros dois alimentos testados, com $22 (\pm 3,92)$ ovos fêmea⁻¹ 24h⁻¹. Sendo 16 vezes maior que a produção média dos copépodes alimentados com *Nannochloropsis occulata*, que ficou em $1,33 (\pm 0,73)$ ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹. E 11 vezes maior que a produção utilizando Culture Selco 3000[®], que atingiu $2 (\pm 0,58)$ ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹ (Figura 3). A média da produção de ovos individual entre os dois últimos tratamentos foi estatisticamente semelhante.

Em relação à produção de pelotas fecais, os copépodes alimentados com *C. mulleri* apresentaram $87,81 (\pm 22,20)$ pelotas indivíduo⁻¹ 24 h⁻¹. Este valor é 36 vezes superior à produção de pelotas fecais média nos copépodes alimentados com *N. occulata* ($2,44 \pm 0,33$ pelotas indivíduo⁻¹ 24 h⁻¹) e 99 vezes maior que a produção dos copépodes alimentados com Culture Selco 3000[®] ($0,89 \pm 0,62$ pelotas indivíduo⁻¹ 24 h⁻¹) (Figura 4). Não foi aplicado teste estatístico aos valores de produção de pelotas fecais devido ao não cumprimento dos pré-requisitos da Análise de Variância.

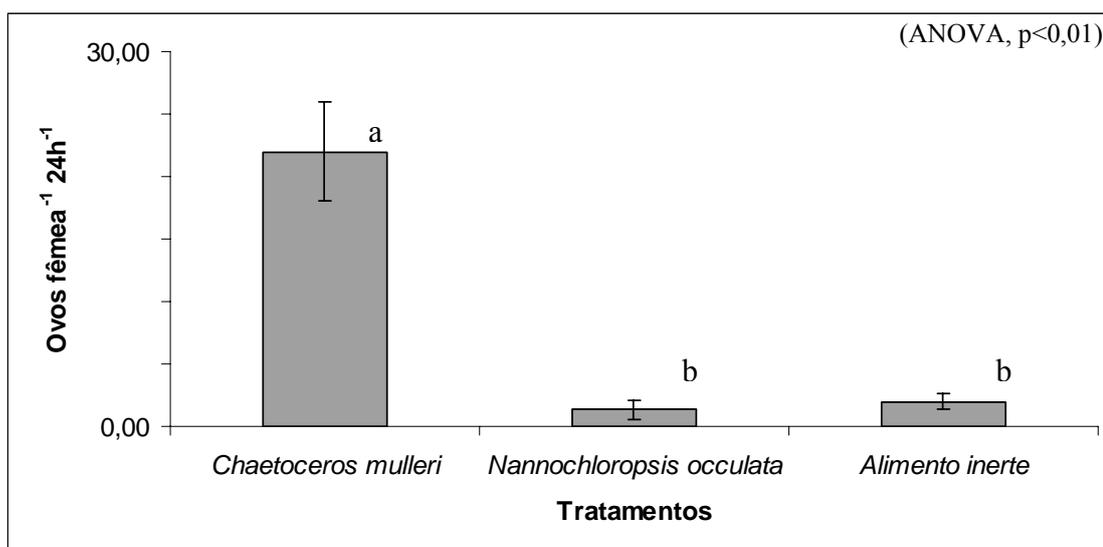


Figura 3 - Produção de ovos por fêmeas de *Acartia tonsa* sob diferentes alimentos durante 24h. Letras diferentes indicam diferenças significativas verificadas por Anova uma via seguida do teste de Tukey.

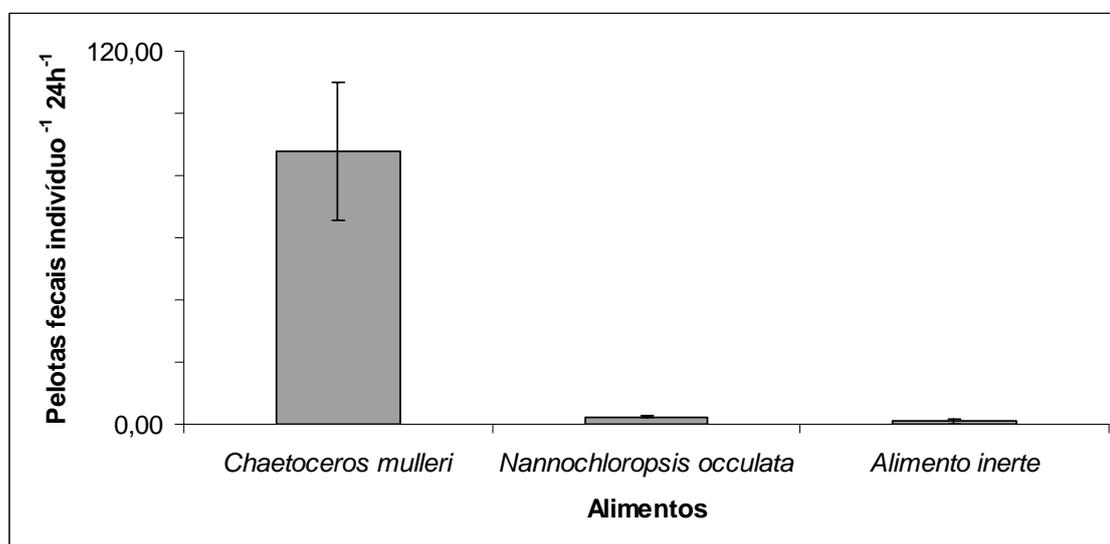


Figura 4 - Produção de pelotas fecais durante 24h por *Acartia tonsa* sob diferentes alimentos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Experimento I: Cultivo de larvas de *Paralichthys orbignyanus* alimentadas com *Acartia tonsa*.

As larvas de linguado alimentadas com *Acartia tonsa* apresentaram um maior percentual de crescimento em comprimento durante o período entre o 7° e o 14° dia após a eclosão, do que durante o 14° e o 22° dia após a eclosão. O maior crescimento das larvas mais jovens pode estar relacionado ao fato de que os náuplios de copépodes são considerados o melhor alimento vivo para a primeira alimentação de larvas de linguados (Bell *et al.* 2003). O tamanho reduzido dos náuplios é adequado para a alimentação das larvas deste linguado, uma vez que as mesmas possuem a boca relativamente pequena (Louzada 2004), igualmente ao que acontece com outras espécies, em diferentes famílias como Lutjanidae e Serranidae (Doi *et al.* 1997, Schipp *et al.* 1999, Marte 2003). Por outro lado, o menor crescimento em comprimento das larvas mais velhas pode ser reflexo de uma alteração do padrão de crescimento, pois as larvas começam a crescer também em largura.

É importante ressaltar que as larvas provenientes do restante da desova mantidas à parte deste experimento, alimentadas com rotíferos, sobreviveram menos de duas semanas após a eclosão.

No 14° dia após a eclosão, as larvas de linguado alimentadas com copépodes já apresentavam o comprimento total entre 5 – 7 mm e, segundo Bianchini *et al.* (2005) já é possível incluir presas maiores na dieta quando as larvas atingem esta faixa de comprimento. Embora tenham sido observados copépodes adultos no tanque em que as larvas estavam sendo cultivadas nesta data, o atraso de seis dias na adição de copepoditos e adultos de *A. tonsa* pode ter determinado o menor crescimento das larvas durante o período entre o 14° e o 22° dia após eclosão. Isto resultou em larvas menores ao final da metamorfose (8,16 mm), enquanto que o comprimento total normal das larvas nesta fase é entre 10 e 15 mm (Bianchini *et al.* 2005).

No que diz respeito ao tempo da metamorfose, mesmo com esta deficiência na alimentação, as larvas iniciaram o assentamento no 19° dia após a eclosão e terminaram no 22°, permanecendo à temperatura média de 22 °C. Okamoto (2004) testou diferentes

temperaturas sobre o desenvolvimento das larvas *Paralichthys orbignyanus*, sendo que no seu estudo, as larvas mantidas a 20 °C iniciaram o processo de metamorfose no 26° dia após a eclosão e terminaram no 35°. Já nas larvas mantidas à temperatura de 23 °C, o início e o final da metamorfose aconteceram respectivamente no 16° e no 20° dia após a eclosão. O período da metamorfose neste experimento foi esperadamente intermediário àqueles definidos por Okamoto (2004), uma vez que a temperatura utilizada (22 °C) era intermediária àquelas testadas por ele. É importante mencionar que Okamoto (2004) utilizou com sucesso rotíferos (10-20 indivíduos mL⁻¹) e artêmias (2-4 indivíduos mL⁻¹) como alimento vivo, conforme a rotina normal da larvicultura de *P. orbignyanus* (Bianchini *et al.* 2005).

O principal fator associado ao bom desempenho dos copépodes, está relacionado provavelmente com o seu perfil nutricional rico em ácidos graxos essenciais, sobretudo DHA (Evjelmo & Olsen 1997). Por exemplo, o copépode *Calanus finmarchicus* é rico em ácidos graxos essenciais às larvas de peixes marinhos, com uma quantidade muito superior aos níveis incorporados por rotíferos e artêmias enriquecidos. Além disso, estes copépodes possuem mais de 50 % de fosfolipídeos, que são capazes de aumentar o crescimento e o desenvolvimento de larvas de peixes marinhos (Bell *et al.* 2003).

Para a criação do turbot, *Psetta maxima*, os náuplios de copépodes calanóides são os alimentos mais eficazes utilizados durante a primeira alimentação, pois o seu padrão de ácidos graxos é semelhante ao das larvas recém eclodidas deste peixe (Ruyet *et al.* 1991). Em relação às larvas de halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, uma dieta à base de copépodes comparada com artêmias, se mostra superior em termos de sobrevivência e é capaz de aumentar em dez vezes o sucesso da metamorfose, além de proporcionar melhor pigmentação, desenvolvimento ocular, e do trato digestivo (Shields *et al.* 1999, Luizi *et al.* 1999).

Este trabalho representa o primeiro registro de uma larvicultura de *P. orbignyanus* utilizando-se exclusivamente *Acartia tonsa* como alimento vivo. O resultado deste estudo demonstrou que as larvas deste linguado são capazes de se alimentar exclusivamente de *A. tonsa* até atingirem a metamorfose. Desta forma, o emprego de apenas uma espécie de alimento vivo durante toda a larvicultura de *P. orbignyanus*, é de grande importância, uma vez que diminui a necessidade de manutenção de diversos cultivos para manter as larvas. Além disso, o uso deste copépode diminui a necessidade

de se cultivar espécies exóticas para a alimentação das larvas. Portanto, o uso de *Acartia tonsa* na larvicultura desse peixe parece ter um grande potencial a ser explorado em estudos futuros.

5.2. Experimento II: Avaliação de diferentes densidades de *Thalassiosira fluviatilis* sobre a produção de ovos de *Acartia tonsa*.

Os resultados apresentados neste experimento demonstraram que a produção de ovos foi fortemente influenciada pela concentração de células de *Thalassiosira fluviatilis*. Isto reforça a idéia de que o copépode *A. tonsa* é muito eficiente na conversão do alimento em ovos (Kjørboe *et al.* 1985, Støttrup & Jensen 1990). Observou-se que a produção de ovos é praticamente nula quando os copépodes estão em inanição, e é considerada significativamente baixa (11 e 18 ovos fêmeas⁻¹ 24h⁻¹) nas menores densidades algais (5.000 e 10.000 células mL⁻¹). Possivelmente a baixa produção esteja ligada à baixa energia disponível nestas densidades de alimento, além disto, *A. tonsa* é mal adaptada às baixas concentrações de alimento, talvez devido a uma reduzida habilidade quimiosensorial (Støttrup & Jensen 1990).

Na densidade de 20.000 células mL⁻¹, a produção de ovos foi de 24,28 ovos fêmea⁻¹ 24h⁻¹. Num estudo realizado por Kjørboe *et al.* (1985) utilizando a microalga *Rhodomonas baltica* como alimento, ficou constatado que *A. tonsa* atinge um valor ótimo de produção de ovos quando alimentada com concentrações algais equivalentes a 500 µg Carbono L⁻¹. Este dado foi utilizado por Bersano (2003) para estimar a concentração de *T. fluviatilis* que deveria ser empregada no sistema. Desta forma, na concentração de 20.000 células mL⁻¹ desta microalga, os copépodes já possuiriam a quantidade de Carbono necessária para atingir a máxima produção de ovos.

Em relação às densidades extremamente altas de *T. fluviatilis*, 40.000 e 80.000 células mL⁻¹, a produção de ovos atingiu os valores de 38 e 60 ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹. Este incremento na produção de ovos nas densidades maiores que 20.000 células mL⁻¹ demonstra que, na verdade a produção máxima de ovos sob uma dieta de *T. fluviatilis*, ocorre em níveis acima de 500 µg de Carbono L⁻¹. Corroborando a qualidade de *T. fluviatilis*, Kaminski (2004) determinou que essa microalga possui a capacidade de maximizar a produção de ovos por *A. tonsa*. Por outro lado, as propriedades nutricionais

das microalgas são sujeitas a variações, desta forma, a maior produção de ovos nas densidades que excedem 20.000 células mL⁻¹ sugere que a microalga apresentava-se em níveis de Carbono sub-ótimos. Deve-se lembrar que este valor foi estimado, e não quantificado para a microalga utilizada no experimento. Foi constatado em observações anteriores que, em densidades acima de 100.000 células mL⁻¹, os copépodes são incapazes de incrementar a produção de ovos (Almeida FM, dados não publicados).

Segundo Cowles *et al.* (1988), um dos fatores que determinam a seleção do alimento é o seu estado nutricional, uma vez que *Acartia tonsa* apresenta maiores taxas de ingestão das células de *Thalassiosira weissflogii* (= *Thalassiosira fluviatilis*) cultivadas em altas taxas de crescimento. Portanto, os copépodes preferem alimentos com maiores níveis de proteínas e aminoácidos livres. Desta forma, o conteúdo de ácidos graxos e a concentração de carbono não são os únicos parâmetros importantes para a produção de ovos dos copépodes, devendo ser considerados também a proporção entre carbono e nitrogênio e o perfil de aminoácidos livres das microalgas (Cowles *et al.* 1988, Kleppel *et al.* 1998).

Sob o ponto de vista prático, é preciso adequar a produção de ovos à demanda de copépodes pelos organismos cultivados. Dentro dos limites da espécie, conforme ocorre o aumento da concentração de algas, a produção de ovos é incrementada. Assim como acontece em *Acartia bifilosa*, cuja produção de ovos é claramente afetada pela disponibilidade de alimento (Koski & Kuosa, 1999).

Entretanto, em condições de cultivo concomitantemente, acontece o aumento da produção de pelotas fecais e o acúmulo de algas não ingeridas no interior do tanque de cultivo. Isto prejudica o funcionamento do sistema, uma vez que as algas não ingeridas se aglutinam e somadas as pelotas fecais, preenchem os poros das malhas utilizadas para a separação automática dos ovos. Com as malhas colmatadas, o sistema pára de funcionar e desta forma a coleta dos ovos produzidos não é realizada.

Outro fator importante é o desgaste individual dos copépodes, que possivelmente será maior se os animais forem induzidos a manter elevadas taxas de produção de ovos. De tal modo, apesar de na densidade de 80.000 células mL⁻¹ a produção de ovos possa ser até 2,5 vezes maior, sugere-se o uso da densidade de 20.000 células mL⁻¹ no sistema de cultivo, pois permite a produção de ovos em níveis razoáveis (~24 ovos fêmea⁻¹ 24 h⁻¹), sem comprometer a estabilidade do sistema de cultivo.

4.3. Experimento III: Influência do alimento inerte e dietas algais sobre a produção de ovos e pelotas fecais de *Acartia tonsa*.

A produção de fitoplâncton é uma das dificuldades atuais do cultivo de copépodes (Schipp *et al.* 1999), pois estes animais possuem a capacidade de selecionar o alimento com base no seu estado nutricional, exigindo que as microalgas sejam de alta qualidade (Cowles *et al.* 1988). Desta forma, uma das alternativas para a otimização do cultivo de copépodes é a utilização de dietas compostas por duas microalgas, permitindo que uma compense as deficiências da outra (Knuckey *et al.* 2005). Por outro lado, a utilização de dietas inertes comerciais em substituição às microalgas representaria a simplificação do cultivo e a abolição do cultivo de espécies exóticas para alimentar os copépodes.

Neste trabalho, as diferenças entre a produção de pelotas fecais dos copépodes alimentados com *Chaetoceros mulleri*, *Nannochloropsis oculata* e Culture Selco 3000[®] mostram que *Acartia tonsa* ingeriu de forma eficiente apenas a primeira microalga. Isto se refletiu na reprodução, pois os copépodes alimentados com *C. mulleri* produziram significativamente mais ovos que os outros dois alimentos, atingindo 22 ($\pm 3,92$) ovos fêmea⁻¹ 24h⁻¹. Enquanto que os alimentados com *N. oculata* produziram 1,33 ($\pm 0,73$) ovos fêmea⁻¹ 24h⁻¹, e com Culture Selco 3000[®] produziram 2 ($\pm 0,58$) ovos fêmea⁻¹ 24h⁻¹. O tamanho das células de *C. mulleri* (maior eixo: 7,29 μm) está dentro da faixa (5 – 10 μm), a qual os copépodes suspensívoros estão adaptados (Berggreen *et al.* 1988), possibilitando a alimentação tanto de náuplios como de adultos. Este fato representa uma nova perspectiva ao cultivo de *A. tonsa*, pois a substituição das duas espécies utilizadas (*Thalassiosira fluviatilis* e *Isochrysis galbana*) por apenas uma microalga na alimentação dos copépodes simplifica o cultivo. Porém, antes de incorporar *C. mulleri* ao método de cultivo de copépodes, é necessário avaliar o efeito de uma dieta composta por apenas esta microalga sobre viabilidade dos ovos e o perfil nutricional dos copépodes produzidos como alimento vivo.

Sobre a microalga *N. oculata*, o resultado negativo era esperado devido a observações anteriores realizadas no cultivo de adultos de *A. tonsa* (Bersano, com. pes.). Segundo Berggreen *et al.* (1988), este copépode possui a capacidade de captura reduzida com partículas que possuam entre 2 e 4 μm . Isto explica a não ingestão de *N. oculata* e de Culture Selco 3000[®], uma vez que as suas células e partículas,

respectivamente, possuem tamanho próximo destes limites. Por outro lado, a composição bioquímica do alimento também deve ser estudada sempre que possível, pois pode influenciar a sua percepção e/ou seleção pelos copépodes. Segundo Kleppel (1993), embora a taxa de ingestão seja proporcional à concentração de partículas alimentares, os copépodes são capazes de selecionar o alimento por detecção química e táctil.

Com relação ao alimento inerte, Culture Selco 3000[®], este estudo comprovou sua ineficácia como alternativa alimentar para *Acartia tonsa*, uma vez que os valores de produção de ovos foram extremamente baixos. Isto corrobora as informações disponibilizadas por Kaminski (2004), que testou outro alimento inerte (Algamac[®]) na dieta deste copépode e verificou a sua inadequação tanto para adultos como para náuplios de *A. tonsa*. Desta forma, permanece esta lacuna sobre este aspecto da alimentação dos copépodes.

No futuro, o desenvolvimento de um alimento inerte específico para copépodes, deverá ser baseado em microalgas adequadas em termos de composição bioquímica como também apresentar uma faixa de tamanho apropriada. Deste modo poderá contribuir para o desenvolvimento de cultivos de copépodes em larga escala.

CONCLUSÕES

- Os copépodes *Acartia tonsa* podem ser utilizados como alimento para larvas de *Paralichthys orbignyanus*. Náuplios substituem com sucesso os rotíferos na fase inicial da larvicultura, os adultos e copepoditos substituem as artêmias.
- A produção de ovos por *Acartia tonsa* é dependente da densidade de alimento.
- Culture Selco 3000[®] e a microalga *Nannochloropsis occulata* são ineficientes na alimentação dos copépodes.
- *Chaetoceros mulleri* possui potencial de ser incorporada ao cultivo de *Acartia tonsa*, uma vez que permite a alimentação tanto de náuplios como de adultos.

LITERATURA CITADA

- ARA, K. 2001. Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, 445: 205-215.
- BARCLAY, W & S ZELLER. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and artemia nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27 (3).
- BELL, JG, LA McEVOY, A ESTEVEZ, RJ SHIELDS & JR SARGENT. 2003. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227: 211-220.
- BERGGREEN, U, B HANSEN & T KIØRBOE. 1988. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.*, 99: 341-352.
- BERSANO, JG. 2003. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. A potential source of live food for aquaculture. *Book abstracts volume I, World Aquaculture 2003*, p 95.
- BIANCHINI, A, W WASIELESKY Jr & KC MIRANDA. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 56:453-459.
- BIANCHINI, A, RB ROBALDO & LA SAMPAIO. 2005. Cultivo do linguado, *Paralichthys orbignyanus*. In: Baldisseroto, B & LC Gomes (ed.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Ed. da UFSM, Santa Maria, Chap. 20: 445-470.
- BRADFORD-GRIEVE, JM, EL MARKHASEVA, CEF ROCHA & B ABIAHY. 1999. Copepoda. In: South Atlantic Zooplankton, Boltovskoy, D. (ed.), Leiden, The Netherlands, p. 869-1098.
- BURKE, JS, T SEIKAI, Y TANAKA & M TANAKA. 1999. Experimental intensive culture of summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*, 176: 135-144.
- CARNEIRO, MH. 1995. Reprodução e alimentação dos linguados *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys orbignyanus* (Pleuronectiformes: Bothidae), no Rio Grande do Sul, Brasil. *Dissertação de mestrado*, Fundação Universidade do Rio Grande, 80p.

- CERQUEIRA, VR, R MIOSO, JAG MACCHIAVELLO & AM BRUGGER. 1997. Ensaio de indução de desova do linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). *B. Inst. Pesca*, 24 (especial): 247-254.
- CHO, CY, CB COWEY & T WATANABE. 1985. Finfish nutrition in Asia – Methodological approaches to research and development, IDRC, Ottawa, 154p.
- COWLES, TJ, RJ OLSON, SW CHISHOLM. 1988. Food selection by copepods: discrimination on the basis of food quality. *Marine Biology*, 100: 41-49.
- DHERT, P, G ROMBAUT, G SUANTIKA & P SORGELOOS. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200: 129-146.
- DÍAZ DE ASTARLOA, JM. 2002. A review of the flatfish fisheries of the south Atlantic Ocean. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37 (002): 113-125.
- DÍAZ DE ASTARLOA, JM & TA MUNROE. 1998. Systematics, distribution and ecology of commercially important paralichthyid flounders occurring in Argentinean-Uruguayan waters (*Paralichthys*, Paralichthyidae): an overview. *Journal of Sea Research*, 39: 1-9.
- DOI, M & T SINGHAGRAIWAN. 1993. Biology and culture of the red snapper *Lutjanus argentimaculatus*. The Research Project of Fishery Resource Development in the Kingdom of Thailand. The Eastern Marine Fisheries Development Center. Thailand 55p.
- DOI, M, JD TOLEDO, MSN GOLEZ, M SANTOS & A OHNO. 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia* 358: 259–263.
- EVJELMO, JO & Y OLSEN. 1997. Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiologia*, 358: 159-162.
- FAO. 2001. Fishery country profile – The Federative Republic of Brazil. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.fao.org/fi/fcp/en/BRA/profile.htm>
- FAO. 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Disponível no endereço eletrônico: <http://www.fao.org/docrep/007/y5600e/y5600e04.htm>

- FUKUSHO, K. 1991. Red sea bream culture in Japan. In: MCVEY, JP. (ed) CRC Handbook of Mariculture, Volume II, Finfish Aquaculture. CRC Press, Boston, 73-87.
- GUILLARD, RRL & JH RYTHER. 1962. Studies of marine diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8:229-239.
- HAIMOVICI, M, AS MARTINS & PC VIEIRA. 1996. Distribuição e abundância de teleósteos demersais sobre a plataforma continental do Sul do Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, 56(1):27-50.
- HAMRE, K. 2006. Nutrition in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles. *Journal of Marine Science*, 63:267-274.
- HILLEBRAND, H, C DÜRSELEN, D KIRSCHTEL, U POLLINGHER, & T ZOHARY. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, 35: 403-424.
- HUNTER, JR. 1981. The feeding behavior and ecology of marine fish larvae. In: Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes. *Bardach JE et alli (Eds.)*. ICLARM, Manila, Philippines.
- KAMINSKI, SM. 2004. Influência da alimentação sobre a reprodução e o desenvolvimento do copépode Calanoida *Acartia tonsa* Dana, 1849, em cultivo intensivo. *Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Aqüicultura – UFSC*. 55p.
- KELLEY, C & C-S LEE. 1991. Milkfish culture in the United States. In: MCVEY, JP. (ed) CRC Handbook of Mariculture, Volume II, Finfish Aquaculture. CRC Press, Boston, 211-226.
- KIØRBOE, T, F MØHLENBERG, & K HAMBURGER. 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26: 85-97.
- KLEPPEL, G.S. 1993. On the diets of calanoid copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 99: 193-195.

- KLEPPEL, GS, BURKART & HOUCHIN. 1998. Nutrition and the regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnol. Oceanogr.*, 43(5): 1000-1007.
- KNUCKEY, RM, GL SEMMENS, RJ MAYER & MA RIMMER. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, 249: 339-351.
- KOSKI, M & H KUOSA. 1999. The effect of temperature, food concentration and female size on the egg production of the planktonic copepod *Acartia bifilosa*. *Journal of Plankton Research*, 21(9): 1779-1789.
- LEE, C-S & CD KELLEY. 1991. Artificial propagation of mullet in the United States. In: MCVEY, JP. (ed) CRC Handbook of Mariculture, Volume II, Finfish Aquaculture. CRC Press, Boston, 193-209.
- LOUZADA, LR. 2004. Efeito do fotoperíodo na sobrevivência e crescimento de larvas e juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Aqüicultura – FURG*. 33p.
- LUBZENS, E, A TANDLER & G MINKOFF. 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, 186-187 (1): 387-400. *Apud* LUBZENS *et al.* 2001.
- LUBZENS, E, O ZMORA & Y BARR. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, 446/447: 337-353.
- LUIZI, FS, B GARA, RJ SHIELDS & NR BROMAGE. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture*, 176: 101-116.
- MARTE, CL. 2003. Larviculture of marine species in Southeast Asia: current research and industry prospects. *Aquaculture*, 227: 293–304
- McEVOY, LA, JC NAVARRO, JG BELL & JR SARGENT. 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, 134: 101-112.

- McKINNON, AD, S DUGGAN, PD NICHOLS, MA RIMMER, G SEMMENS, & B ROBINO. 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223: 89-106.
- NAYLOR, RL, SL WILLIAMS & DR STRONG. 2001. Aquaculture - A gateway for exotic species. *Science*, 294 (5547): 1655-1656.
- OKAMOTO MH. 2004. Efeitos da temperatura sobre ovos e larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Aqüicultura – FURG*. 27p.
- PAYNE, MF & RJ RIPPINGALE. 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gradiolerens imparipes*. *Aquaculture*, 201: 329-342.
- PAYNE, MF, RJ RIPPINGALE & JJ CLEARY. 2001. Cultured copepods as food for west Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, 194: 137-150.
- RAINUZZO, JR, KI REITAN & Y OLSEN. 1997. The significance of lipids at early life stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155: 103-115.
- RUYET JP, F BAUDIN-LAURENCIN, N DEVAUCHELLE, R MÉTAILLER, J NICOLAS, J ROBIN & J GUILLAUME. 1991. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*). In: MCVEY, JP. (ed) CRC Handbook of Mariculture, Volume II, Finfish Aquaculture. CRC Press, Boston, 21-41.
- SARGENT, JR, LA McEVOY & JG BELL. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine larval feeds. *Aquaculture*, 155:117-127.
- SCHIPP, GR, JMP BOSMANS, & AJ MARSHALL. 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174: 81-88.
- SHIELDS, RJ, J GORDON BELL, FS LUIZI, B GARA, NR BROMAGE & JR SARGENT. 1999. Natural copepods are superior to enriched artemia nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: Relation to dietary essential fatty acids. 1999. *American Society for Nutritional Sciences*, 1186-1194.

- SORGELOOS, P, P DHERT & P CANDREVA. 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200: 147-159.
- STØTTRUP, JG. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Res.*, 31: 703-711.
- STØTTRUP, JG & J JENSEN. 1990. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 141: 87-105.
- TAKEUCHI, T. 2001. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 200: 203-222.
- WASIELESKY Jr, W, K MIRANDA & A BIANCHINI. 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 38:385-395.
- WASIELESKY Jr, W, A BIANCHINI, MHS SANTOS & LH POERSCH. 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult. Soc.*, 28:202-204.