

# Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos

Pedro M. Pousão Ferreira

Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P.

**IPIMAR**

# Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos



Pedro M. Pousão Ferreira

IPIMAR - 2009

(ISBN: 978-972-9372-37-7)

## INDICE

<b>PRODUÇÃO DE LARVAS DE PEIXES MARINHOS.....</b>	<b>1</b>
ASPECTOS GERAIS .....	1
METODOLOGIA DE CULTIVO.....	3
1) PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS:.....	3
a) <i>Qualidade da água</i> .....	3
b) <i>Tipo de tanques, circulação de água e fotoperíodo</i> .....	4
2) PARÂMETROS BIOLÓGICOS:.....	5
a) <i>Densidade de cultivo larvar</i> .....	5
b) <i>Alimentação larvar</i> .....	5
<i>Tipo de alimento</i> .....	7
<i>Cultivo larvar de sargo</i> .....	11
c) <i>Nutrição</i> .....	13
<i>Alimentação com inertes</i> .....	16
d) <i>Patologia e as malformações</i> .....	16
3) PERÍODOS CRÍTICOS .....	17
4) OBJECTIVOS .....	20
<i>Referências bibliográficas</i> .....	22
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>35</b>
<b>Fitoplâncton – microalgas</b> .....	35
INTRODUÇÃO .....	35
<i>Critérios de selecção das microalgas</i> .....	36
METODOLOGIA DE PRODUÇÃO .....	41
CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	42
<i>Parâmetros físico-químicos</i> .....	42
<i>Infraestruturas</i> .....	43
<i>Equipamentos</i> .....	43
<i>Outros</i> .....	43
MANUTENÇÃO DE INÓCULOS (PEQUENOS VOLUMES) .....	44
a) <i>Culturas de inóculo em meio líquido</i> .....	45
b) <i>Culturas "stock" em meio sólido</i> .....	48
OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INÓCULOS.....	48
PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA .....	51
a) <i>Volumes intermédios</i> .....	52
b) <i>Grandes volumes</i> .....	55
ESTRUTURAS DE PRODUÇÃO .....	56
<i>Fotorreactores ou fotobiorreactores</i> .....	58
CONTAMINAÇÕES.....	60
AR.....	60
ÁGUA.....	60
EQUIPAMENTOS .....	61
INOCULOS E MEIOS COM NUTRIENTES .....	62
CULTIVO HETEROTRÓFICOS .....	63
APLICAÇÃO EM CULTIVOS MARINHOS.....	64
<i>O género Nannochloropsis</i> .....	66
<i>Perfil em ácidos gordos de Nannochloropsis spp.</i> .....	67
<b>PERFIL EM ÁCIDOS GORDOS DE MICROALGAS UTILIZADAS NO CULTIVO DE DOURADA E</b>	
<b>OUTROS ESPARIDEOS</b> .....	68
• <i>Comparação do perfil lipídico de várias espécies de microalgas</i> .....	72
<i>Considerações finais</i> .....	85
<i>Referências bibliográficas</i> .....	87

ANEXO I.....	96
<i>Composição do Meio de Guillard (modificado)</i> .....	96
ANEXO II.....	98
<i>Composição do Meio de Walne (Modificado)</i> .....	98
ANEXO III.....	100
<i>Composição do meio F/2</i> .....	100
ANEXO IV.....	102
<i>Preparação do meio sólido para fitoplâncton</i> .....	102
ANEXO V.....	103
<i>Procedimentos para a Câmara de Burkner</i> .....	103
ANEXO VI.....	105
- <i>Procedimentos para a Câmara de Newbauer</i> .....	105
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>106</b>
<b>Zooplâncton - rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i> e <i>Brachionus rotundiformis</i>) .....</b>	<b>106</b>
INTRODUÇÃO .....	106
OS ROTÍFEROS .....	107
BIOLOGIA.....	108
CICLO DE VIDA DE BRACHIONUS PLICATILIS .....	112
TECNOLOGIA DE CULTIVO .....	115
CULTURAS STOCK .....	116
- CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES.....	116
CULTURAS INTERMÉDIAS .....	117
<i>Método descontínuo</i> .....	117
<i>Método semi-contínuo</i> .....	117
CULTURAS DE PRÉ-PRODUÇÃO .....	118
CULTIVO INTENSIVO EM GRANDES VOLUMES .....	118
PRODUÇÃO.....	120
<i>Alimentação</i> .....	122
<i>Cálculo da densidade e crescimento</i> .....	123
<i>Colheita e utilização</i> .....	126
METODOLOGIAS EM DESENVOLVIMENTO .....	128
BIOENCAPSULAÇÃO .....	130
TANQUES E EQUIPAMENTOS .....	132
CULTURA E BIOENCAPSULAÇÃO DE ROTÍFEROS .....	135
CASOS ESTUDADOS .....	138
BIOENCAPSULAÇÃO DE ROTÍFEROS COM MICROALGAS .....	143
BIOENCAPSULAÇÃO DE ROTÍFEROS COM EMULSÕES LIPÍDICAS E PRODUTOS COMERCIAIS.....	150
<i>Considerações finais</i> .....	160
<i>Referências bibliográficas</i> .....	163
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>169</b>
<b>Zooplâncton - Artémia (<i>Artemia</i> spp.) .....</b>	<b>169</b>
INTRODUÇÃO .....	169
ESTIRPES .....	172
ESTIRPES E SUA UTILIZAÇÃO .....	173
OBTENÇÃO DE NÁUPLIOS .....	174
DESCAPSULAÇÃO.....	179
INCUBAÇÃO DIRECTA .....	182
UTILIZAÇÃO DE NÁUPLIOS RECÉM-ECLODIDOS .....	183
BIOENCAPSULAÇÃO .....	184
<i>Utilização de lipossomas</i> .....	188
TANQUES E EQUIPAMENTOS .....	190
UTILIZAÇÃO DE ARTEMIA SPP. EM AQUACULTURA .....	192
<i>Estirpes com maior valor nutritivo</i> .....	192
<i>Estirpes com menor valor nutritivo</i> .....	197

- Perfil dos principais ácidos gordos e grupos de ácidos gordos de <i>Artemia</i> spp. em inanição.....	200
- Bioencapsulação de <i>Artemia</i> spp. com diferentes microalgas.....	201
- Bioencapsulação de <i>Artemia</i> spp. com emulsões lipídicas preparadas em laboratório.....	204
- Bioencapsulação de <i>Artemia</i> spp. com emulsões lipídicas comerciais.....	211
- Fornecimento de náuplios aos tanques larvares.....	218
- Efeito do enriquecimento da cadeia trófica para a larvicultura de <i>Sparus aurata</i> .....	220
Considerações finais sobre a utilização de <i>Artemia</i> spp. ....	221
Referência bibliográficas .....	223
ANEXO I.....	229
<i>Solução de descapsulação</i> .....	229
CONSIDERAÇÃO FINAL .....	231

## Produção de larvas de peixes marinhos

### Aspectos gerais

As espécies produzidas em piscicultura marinha em Portugal e Sul da Europa, são o robalo (*Dicentrarchus labrax*), a dourada (*Sparus aurata*) e mais recentemente e ainda em pequena escala o linguado (*Solea senegalensis*), os sargos (*Diplodus puntazzo* e *Diplodus sargus*), o pargo (*Pagrus pagrus*), a dourada japonesa (*Pagrus major*) entre outras.

Os juvenis para estes cultivos são produzidos em cativoiro, em maternidades (“hatcheries”), onde se mantêm reprodutores com vista à obtenção de larvas a partir de posturas naturais ou controladas. Na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPIMAR são também produzidos o sargo safia (*Diplodus vulgaris*) e o sargo veado (*Diplodus cervinus*).

Devido às suas reduzidas dimensões e comportamento, as larvas de peixes marinhos, têm necessidades nutritivas específicas, precisando para isso de ter à sua disposição presas vivas com movimentos compatíveis com os seus mecanismos de captura e predação e com dimensões adequadas à dimensão das suas bocas, permitindo a sua fácil captura e ingestão. Nesta fase é necessário fornecer não só presas vivas de pequenas dimensões mas também em quantidade, de forma a facilitar o seu encontro e a sua captura pelas larvas, rectificando-se de acordo com o seu consumo ao longo do dia.

Inicia-se o fornecimento de alimento quando a grande maioria da população apresenta a boca aberta e é capaz de se alimentar. Deste modo, quando o seu aparelho digestivo se torna funcional, a aceitabilidade do primeiro alimento exógeno é a primeira fase crítica do seu desenvolvimento, que requer uma adaptação e aprendizagem de captura das presas (zooplâncton) que devem estar disponíveis em quantidade e com qualidade. As larvas que não se conseguem adaptar à alimentação exógena morrem ao fim de 8-10 dias. São vários os factores que interferem no processo de aprendizagem e captura: funcionalidade dos

fotorreceptores (células sensoriais visuais) das larvas, disponibilidade e dimensão das presas, correntes provocadas pela circulação e arejamento da água. Deste modo, o sucesso dos cultivos está dependente das condições ambientais e das disponibilidades nutricionais.

Nas primeiras fases de desenvolvimento, ocorrem grandes mortalidades, que em geral são atribuídas ao processo inerente à adaptação do primeiro alimento exógeno (Busch, 1996), embora também possam ser muitas vezes o resultado de uma alimentação inadequada (dimensão, qualidade nutritiva e quantidade das presas) ou a manuseio deficiente (distribuição do alimento, limpeza dos tanques, iluminação, ou outros problemas técnicos). Uma alimentação inadequada leva normalmente a menores crescimentos e a taxas de mortalidade mais elevadas (Barahona-Fernandes, 1978; Busch, 1996; Chatain & Ounais-Guschemann, 1991; Howell, 1983 & May, 1974 *In* Yúfera & Pascual 1984; Rodriguez *et al.*, 1997; Tandler *et al.*, 1995a; Yúfera *et al.*, 1991; Yúfera *et al.*, 1993).

A quantidade das presas tem de ser elevada de forma a suprir as necessidades alimentares das larvas, e a serem facilmente detectadas e capturadas, numa fase em que quer a sua visão quer a sua natação são deficientes. A qualidade é determinante para que as larvas obtenham os nutrientes necessários ao seu normal desenvolvimento. O valor nutritivo deverá ser adequado à espécie em cultivo pelo que se utilizam técnicas de bioencapsulação ou enriquecimento nutritivo que permitem a produção de presas com requisitos nutricionais elevados, principalmente em ácidos gordos da série *n-3* e em aminoácidos.

A produção de fitoplâncton e de zooplâncton, constitui o que se designa por cultivos auxiliares ou cultivos de apoio, isto é, cultivos que se efectuam em paralelo ou complementarmente aos cultivos principais, e que têm como objectivo a produção de alimento vivo para alimentar as larvas dos peixes marinhos.

A produção desta cadeia trófica tem de ser adequada ao consumo diário pelas larvas e a eventuais perdas por mortalidades ou outros acidentes.

Representando um cultivo do qual vai estar dependente o sucesso da produção larvar, é fundamental que as técnicas de produção de microalgas e

zooplâncton estejam dominadas e de acordo com as necessidades diárias da maternidade.

### **Metodologia de cultivo**

O cultivo larvar é bastante mais difícil e problemático que a alevinagem e a engorda, necessitando de um controlo rigoroso e de uma gestão adequada.

Os aspectos mais importantes relacionados com a metodologia de cultivo larvar são:

#### **1) Parâmetros zootécnicos:**

- a) A manutenção da qualidade da água;
- b) Tipo de tanques, circulação de água e fotoperíodo.

##### a) Qualidade da água

As larvas são extremamente sensíveis à manipulação e aos parâmetros físico-químicos e ambientais que devem ser mantidos constantes, evitando mudanças bruscas. Os valores considerados críticos variam de espécie para espécie e com a idade das larvas (Guillen *et al.*, 1993; Guillen *et al.*, 1994a; Guillen *et al.*, 1994b; Lin, 1992; Person-Le Ruyet *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997).

As densidades larvares estão muitas vezes relacionadas com a manutenção da qualidade da água, pois as moléculas resultantes da desassimilação do metabolismo dos animais estabelecidos assim como provenientes da degradação das larvas mortas e do alimento fornecido e não consumido, são os principais responsáveis pelas alterações da qualidade da água. No entanto, a água fornecida aos tanques nesta fase deverá ser continuamente monitorizada pois as larvas são muito mais sensíveis, do que os juvenis ou adultos, para valores muito mais baixos dos parâmetros físico-químicos, assim como a alterações bruscas.

Estes parâmetros devem encontrar-se dentro dos seguintes valores:



- temperatura - 16-20°C, de preferência 19±1°C
- oxigénio (O<sub>2</sub>) dissolvido - 90% a 100% de saturação
- salinidade - 25-38
- pH - 8±0.5
- amónia total - <0,005 ppm
- nitrito - <0,002 ppm

#### b) Tipo de tanques, circulação de água e fotoperíodo

Os cultivos das primeiras fases larvares, principalmente na dourada e outros esparídeos em que as larvas são pequenas e frágeis, fazem-se em tanques com um mínimo de circulação de água e ar, de modo a evitar correntes que provoquem o arrastamento involuntário das larvas. Em relação ao arejamento utiliza-se um tubo central sem difusor - as pequenas bolhas deste podem ser ingeridas pelas larvas - com o ar debitado bolha a bolha. Nos tanques com larvas de dourada (<500 litros), não devem observar-se, em simultâneo, mais que 3 a 4 bolhas em ascensão. O arejamento nesta fase serve principalmente para quebrar a tensão superficial da água, provocar uma corrente ascendente, distribuir homogeneamente as presas e evitar a formação de zonas mortas (sem circulação). O consumo de oxigénio pelas larvas é baixo não havendo necessidade de um arejamento maior.

A água para os tanques larvares deverá ser submetida a uma filtração e tratamento mais eficiente do que para as outras fases do crescimento. Normalmente utiliza-se:

- Uma bateria de 4 a 6 filtros de cartucho descartáveis (“cartridge”), com porosidade decrescente entre 50 µm e 1 µm;
- Tratamento por radiação ultra-violeta de modo a reduzir a carga bacteriana;
- Desgasificação (remoção do azoto), através de uma coluna dimensionada de acordo com o caudal de água, quando existe uma bombagem directa para os tanques. Quando se utilizam filtros de cartucho, os caudais diminuem substancialmente pelo que também é necessário forçar a filtragem através da bombagem de água através destes.

## **2) Parâmetros biológicos:**

- a) Densidade de cultivo larvar;
- b) Alimentação;
- c) Nutrição;
- d) Patologia e as malformações.

### **a) Densidade de cultivo larvar**

A densidade de larvas inicial varia entre 50 a 150 larvas.L<sup>-1</sup>, definindo-se a densidade inicial de acordo com:

- Espécie a cultivar,
- Sobrevivência,
- Objectivos de produção,
- Protocolo de produção
- Infra-estruturas da maternidade,
- Experiência dos técnicos.

Em espécies em que a sobrevivência larvar é mais elevada, como o linguado (sobrevivências acima de 50%), normalmente iniciam-se os tanques com densidades de 50 larvas.L<sup>-1</sup>. De qualquer modo, mesmo para outras espécies quando se observam sobrevivências acima do esperado é vulgar desdobrar os tanques, diminuindo a densidade.

### **b) Alimentação larvar**

O plano alimentar é estabelecido em presas.mL<sup>-1</sup>, de acordo com:

- Espécie a cultivar,
- Sobrevivência,
- Idade das larvas,
- Temperatura da água,
- Consumo ao longo do dia (corrigindo-se sempre que necessário).

Nesta fase larvar inicial de adaptação ao alimento exógeno, é necessário fornecer presas vivas de pequenas dimensões, rotíferos, dependendo da espécie de peixe em cultivo, (*Brachionus rotundiformis* e posteriormente *Brachionus plicatilis*), em quantidade - entre 5 a 15 rot.mL<sup>-1</sup> de forma a facilitar a sua captura pelas larvas, rectificando-se de acordo com o seu consumo ao longo do dia - e com qualidade nutritiva principalmente no que se refere ao seu conteúdo em ácidos gordos altamente insaturados (HUFA). Por norma mantém-se um mínimo de 5 rot.mL<sup>-1</sup>, de forma a facilitar a sua localização e captura pelas larvas.

Devido a esta artificial - elevada disponibilidade de presas nos tanques, é usual fornecer uma microalga concentrada, cerca de 1 a 2% do volume do tanque, juntamente com as presas ao longo do dia, de modo a manter o valor nutritivo dos rotíferos e a qualidade da água. Esta técnica, denominada de “água verde” e os seus efeitos serão descritos no capítulo I.

A administração do alimento deverá ser sempre feita em função do consumo, de modo a evitar a acumulação de presas nos tanques, que sem se alimentarem, perdem o seu valor nutritivo.

Existem alguns microencapsulados e micro-dietas secas no mercado, além de outros produtos experimentais como rações hidrolisadas, microcapsulas e lipossomas para as fases larvares. Este tipo de micro-alimentos apresenta ainda problemas de estabilidade na coluna de água, de perda dos nutrientes por dissolução e de digestibilidade total ou parcial pelas larvas. Deste modo, a substituição total das presas vivas, ainda se encontra em fase de desenvolvimento experimental pelo que são, normalmente, fornecidos em complemento com as presas vivas, numa idade mais avançada das larvas por se obter um melhor crescimento e sobrevivência ou para não se comprometer os resultados conseguidos com presas vivas, (Fernandez-Diaz *et al.*, 1994; Fernandez-Diaz & Yúfera, 1995; Goldan *et al.*, 1997; Kolkovski *et al.*, 1997; Kolkovski, 2001; Lee, 2003; Pousão-Ferreira *et al.*, 1996; Robin & Vincent, 2003; Tandler & Kolkovski, 1991; Tandler & Kolkovski, 1992; Yúfera *et al.*, 1995; Yúfera *et al.*, 1996).

Por outro lado, tem-se tentado introduzir os cultivos de copépodes como a *Acartia* spp., *Temora* spp. e *Eurytemora* spp. que, por apresentarem melhor perfil em EPA e em DHA e na série *n-3*, quer quando colhidos no meio natural quer após bioencapsulação, permitiriam fornecer maiores quantidades de ácidos gordos essenciais aos peixes marinhos (Evjemo *et al.*, 2003; Hamre *et al.*, 2005; Koven, 2003; Rajkumar *et al.*, 2006). O principal problema surge na sua produção em grandes quantidades que permitam numa maternidade serem alternativa aos rotíferos ou à *Artemia* spp.

Utilizando a dourada como exemplo, verificamos que as larvas eclodem com saco vitelino e sem olhos, boca ou tubo digestivo funcionais e durante os primeiros três dias após a eclosão (DAE) passam longos períodos pouco activas (ou imobilizadas). O crescimento logo após a eclosão é rápido mas diminui durante os três dias em que o saco vitelino se aproxima da depleção. No 4º ou 5º DAE, dependente da temperatura da água, as larvas já têm a boca aberta funcional, os olhos pigmentados, o saco vitelino praticamente vazio e apresentam um tubo digestivo rudimentar. As larvas são agora capazes de manter uma posição de natação horizontal e procuram activamente as presas. O crescimento aumenta agora um pouco, assim como a capacidade de depredação.

### Tipo de alimento

O tipo de presas a fornecer deverá estar de acordo com a possibilidade de ingestão - tamanho da boca - por parte das larvas. O primeiro alimento a fornecer, a partir do 3ª ou 4º DAE, são os rotíferos, no caso da dourada, dos sargos e do pargo, e posteriormente a *Artemia* spp.

No caso do robalo (a partir do 8º DAE) e do linguado (a partir do 3º DAE) a primeira alimentação, pode ser constituída por *Artemia* spp. das estirpes de menores dimensões. No entanto, para ambas as espécies, pode utilizar-se adicionalmente rotíferos durante os primeiros dois ou três dias, permitindo às larvas de menores dimensões alimentarem-se e, principalmente, permitindo oferecer um alimento bioencapsulado. Isto não é possível com náuplios de *Artemia* sp. recém-eclodidos

porque ainda não se alimentam. O plano alimentar apresentado (Figs. 1 a 4) para larvas de dourada, robalo e linguado é exemplificativo devendo ser adaptado de acordo com as condições abióticas de cultivo, a dimensão das larvas, dimensão e tipo de tanque e a experiência do operador.

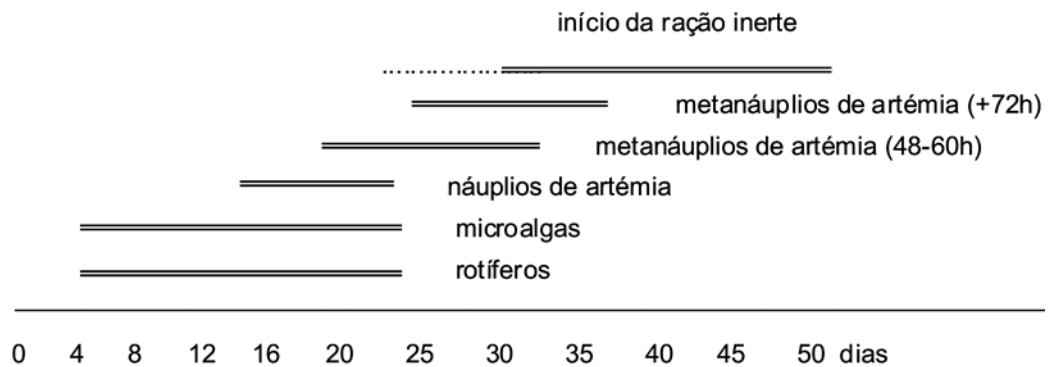


Figura 1 - Distribuição de alimento em larvas de dourada. Idade em dias, tempª ±20°C.

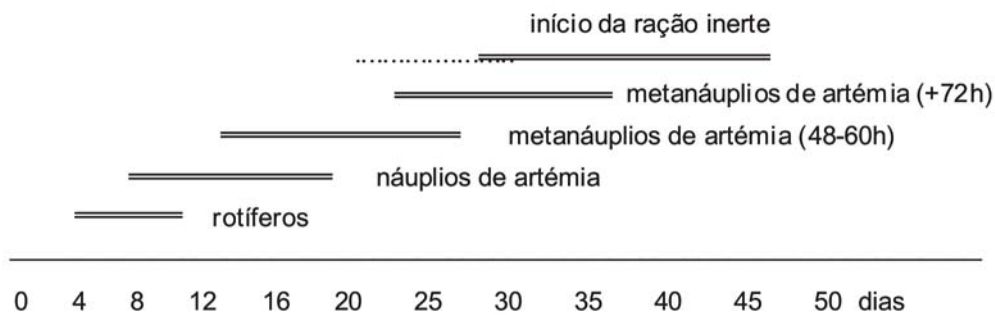


Figura 2 - Distribuição de alimento em larvas de robalo. Idade em dias, tempª 20°C.  
Método tradicional.

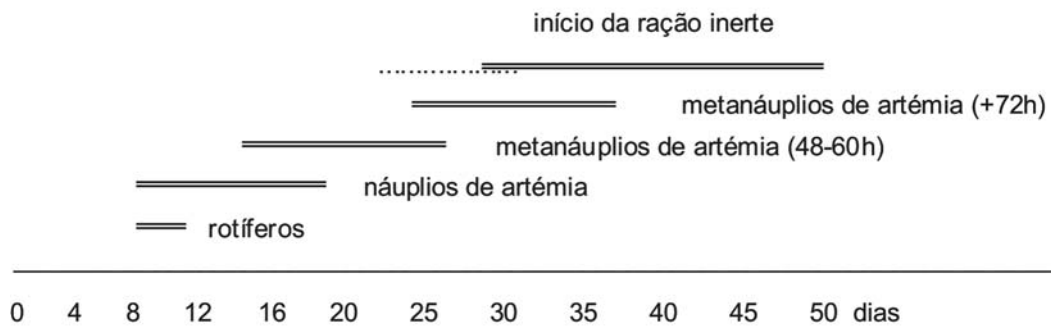


Figura 3 - Distribuição de alimento em larvas de robalo. Idade em dias, tempª 20°C. Método actual. (Sal. 20-25, obscuridade entre o 4º e o 9º dia, tempª 17º-18°C, 30% luz entre o 9º e o 18º dia, tempª 19-20°C, até 100% luz a partir do 18º dia).

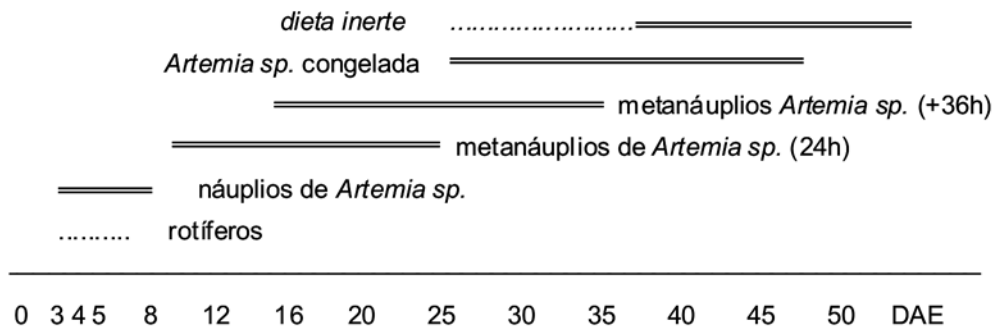


Figura 4 - Distribuição de alimento em larvas de linguado. Idade em dias, tempª 19°C.

A técnica tradicional de cultivo larvar do robalo, por vezes denominada de "estática" (Estevez & Planas, 1987) ou "clássica", caracteriza-se por iniciar a alimentação das larvas logo desde a abertura da boca (cerca de 4 dias após a eclosão), através do fornecimento de rotíferos, adicionando microalgas aos tanques (Johnson & Katavic, 1986), do mesmo modo que se emprega no cultivo larvar de dourada.

Esta técnica foi alterada após se ter compreendido que as larvas tinham um comportamento de fototactismo negativo. Este comportamento leva a que as larvas se afastem da superfície do tanque (da luz) e conseqüentemente a que as taxas de

insuflação da bexiga gasosa sejam bastante reduzidas. Foi possível observar que se permanecessem na escuridão (tapando o tanque), além de se melhorar substancialmente as taxas de insuflação da bexiga, as larvas diminuía a actividade e atingiam maiores dimensões com as reservas vitelinas, conseguindo mesmo ingerir *Artemia* spp. como primeiro alimento. Assim, este jejum permitiu que a primeira alimentação com rotíferos, usualmente ao 4º dia, fosse substituída pela de *Artemia* spp. recém-eclodida ao 8º-9º DAE, com evidentes benefícios do ponto de vista económico pela eliminação de um dos elos da cadeia alimentar (Chatain, 1991).

Inicia-se o fornecimento de alimento quando a grande maioria da população é capaz de se alimentar, e antes de qualquer inibição significativa do crescimento ou mortalidade (Johnson & Katavic, 1986). Os mesmos autores sustentam que o alimento inicial pode ser retardado até 5 dias após a abertura da boca, sem que se altere o crescimento ou a taxa de sobrevivência, a salinidades de 26. De igual modo Estevez & Planas (1987) propõem 10 dias de jejum, a partir da eclosão, enquanto Weppe & Joassard (1986) referem um período de obscuridade, e portanto, de jejum, durante a reabsorção do saco vitelino.

Segundo Barahona-Fernandes & Girin, (1977), dada a fraca capacidade predatória inicial das larvas do robalo, a diferença de crescimento registada entre larvas que começam a alimentar-se logo após a abertura da boca, e as que foram forçadas a um jejum inicial, só tem significado nos primeiros 15 dias de vida, desaparecendo ao fim do primeiro mês após a eclosão. Nas Figura 3 e 4 comparam-se os dois métodos.

Actualmente, o cultivo larvar de robalo é feito a diversas salinidades que vão desde 0 até à salinidade normal de 35. No entanto, a prática mais corrente é trabalhar a salinidades entre 15 e 25 e nalguns casos 10. O abaixamento da salinidade é normalmente feito após a insuflação da bexiga gasosa, a partir do 8-10º dia, permanecendo nos primeiros dias a cerca de 20. Esta salinidade mais baixa parece ter vantagens em termos de sobrevivência diminuindo os problemas patológicos.

## Cultivo larvar de sargo

No caso do sargo (*Diplodus sargus*) e de outros esparídeos o plano é ainda preliminar, visto a pouca experiência no seu cultivo (Pousão-Ferreira *et al*, 2005). No entanto, além dos resultados obtidos serem bastante positivos (Pousão-Ferreira *et al.*, 1997a) são similares ao de outros autores para a mesma espécie ou espécies similares (Caggiano *et al.*, 1993; Cejas *et al.*, 1993; Divanach *et al.*, 1993; Gómez & Ros, 1993).

Na Figura 5 apresenta-se um plano alimentar comparativo, até aos 30 dias de idade após eclosão (DAE), entre várias espécies de sargos - sargo comum (*Diplodus sargus*), sargo safia (*Diplodus vulgaris*), sargo veado (*Diplodus cervinus*) e sargo bicudo (*Diplodus puntazzo*) - e dourada (*Sparus aurata*). Tal como no cultivo de dourada, nestas espécies também se junta microalga ao tanque (“água verde”) durante a fase de fornecimento de rotíferos.

Na Figura 6 apresenta-se um gráfico comparativo de crescimento linear de larvas de *Diplodus sargus*, *D. cervinus*, *D. vulgaris*, *D.puntazzo* e *Sparus aurata*.



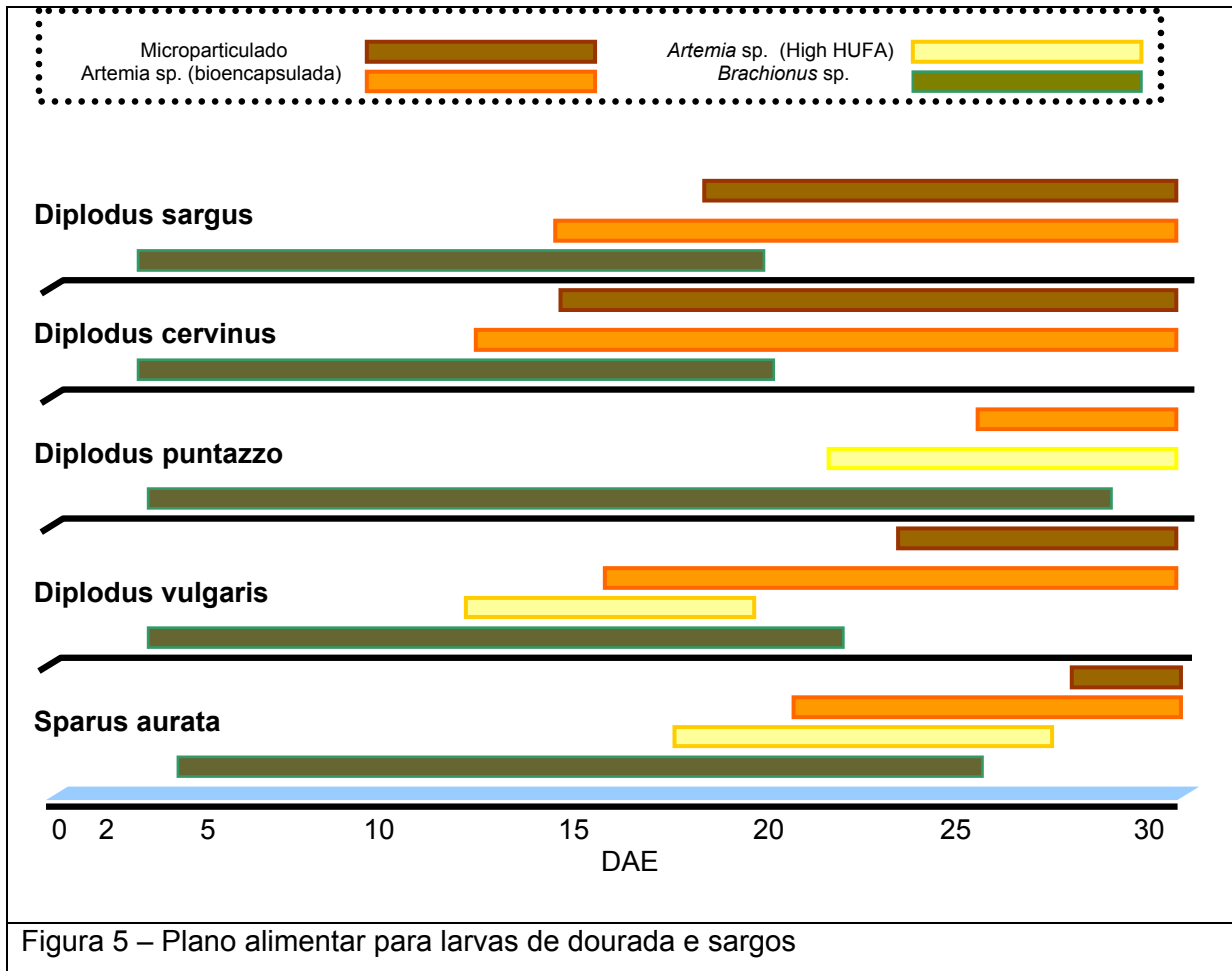


Figura 5 – Plano alimentar para larvas de dourada e sargos

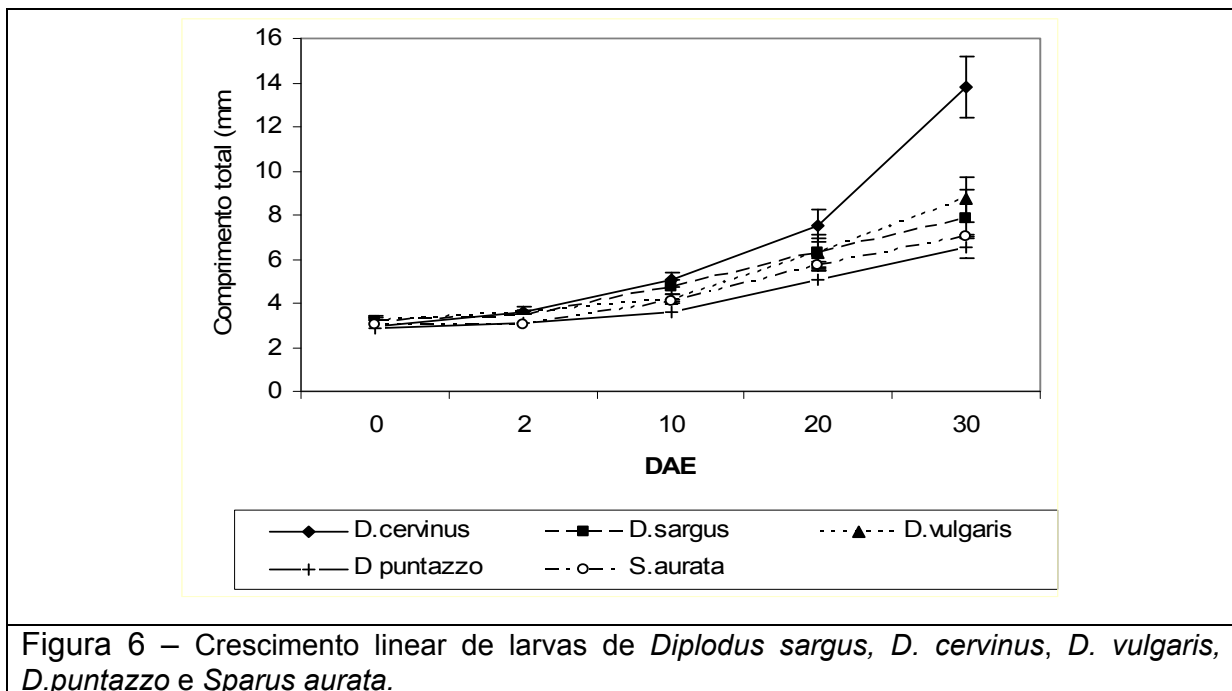


Figura 6 – Crescimento linear de larvas de *Diplodus sargus*, *D. cervinus*, *D. vulgaris*, *D.puntazzo* e *Sparus aurata*.

### c) Nutrição

Os lípidos representam pelo menos 10% do peso seco dos tecidos, principalmente sob a forma de lípidos polares constituintes das membranas celulares, e cerca de 50% do peso seco do cérebro (Sargent *et al.*, 1993). Principalmente os ácidos gordos de cadeia longa altamente insaturados (HUFA) da série *n*-3 e dentro destes o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5*n*-3) e, particularmente, o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6*n*-3) são essenciais para as larvas dos peixes marinhos, estando presentes em grandes quantidades nos tecidos. Para além do conteúdo individual destes ácidos a razão DHA/EPA é também importante na nutrição larvar (Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1997). O DHA (22:6*n*-3) está presente em quantidades elevadas no cérebro e na retina, o qual apresenta um papel estrutural importante e específico nas membranas celulares neurais (Mourente, 2003; Navarro *et al.*, 1997; Sargent, 1995). Uma diminuição de DHA pode levar a uma redução da visão e a uma maior dificuldade na localização das presas. As larvas dos peixes marinhos não apresentam capacidade de converter os PUFA C18 nos seus homólogos HUFA C20 e C22, por apresentarem uma actividade muito baixa e negligenciável do enzima  $\Delta$ -5 desaturase. Deste modo, têm de incorporar o ácido araquidónico (ARA, 20:4*n*-6), EPA (20:5*n*-3) e DHA (22:6*n*-3) através do alimento. Podem converter EPA em DHA mas em quantidades insuficientes para satisfazer as elevadas necessidades em 22:6*n*-3 durante o crescimento (Sargent *et al.*, 1993; Sargent *et al.*, 1997). Os requisitos dos peixes em PUFA da série *n*-6 são pequenos, embora devam estar presentes na dieta, porque os eicosanóides, com maior actividade biológica, as prostaglandinas e os leucotrienos, têm origem no ARA. (Bransden *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 1993).

Deste modo, os ácidos gordos são importantes para o crescimento, desenvolvimento normal e sobrevivência das larvas de peixes marinhos (Bell *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1980; Izquierdo *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1994a; Rodriguez *et al.*, 1994b; Salhi *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1983). Têm um papel importante para a formação de biomembranas e para a produção de

energia durante o seu desenvolvimento (Watanabe *et al.*, 1978; Takeuchi *et al.*, 1996; Tocher & Sargent, 1984; Tocher *et al.*, 1985 *In* Rodriguez *et al.*, 1993). A deficiência destes ácidos nas dietas pode levar a uma variedade de patologias incluindo comportamentos anormais deficiências no crescimento e aumentos das taxas de mortalidade (Koven & Kissil, 1984; Tocher *et al.*, 1997). No caso dos peixes planos, como o linguado e o pregado, o ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) e a relação EPA/ARA parecem ter um papel primordial na pigmentação e na migração do olho (Bell *et al.*, 2003; Hamre *et al.*, 2005). O mesmo efeito na pigmentação parece constatar-se no bacalhau (*Gadus morhua*), (Bransden *et al.*, 2005). Na dourada parece ter um papel importante na sobrevivência e resistência ao manuseamento (Koven *et al.*, 2001, Van Anholt *et al.*, 2004).

Embora as necessidades nutricionais das larvas e o seu metabolismo não estejam ainda totalmente entendidos, vários estudos têm sido conduzidos para determinar as necessidades em ácidos gordos essenciais (EFA) das larvas de peixes marinhos (Bell *et al.*, 1996; Cairrão *et al.*, 1991; Le Milinaire *et al.*, 1983; Ibeas *et al.*, 1994; Ibeas *et al.*, 1996; Izquierdo *et al.*, 1992; Kanazawa *et al.*, 1997; Kissil & Koven, 1990; Koven *et al.*, 1989; Koven, *et al.*, 1990; Koven *et al.*, 1992; Koven, *et al.*, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Mourente & Vazquez, 1996; Ostrowski & Divakaran, 1990; Perez *et al.* 1994; Pousão-Ferreira *et al.*, 1997b; Rodriguez *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1994a; Rodriguez *et al.*, 1994b; Rodriguez *et al.*, 1994c; Sargent, 1995; Silversand *et al.*, 1996; Stottrup & Attramadal, 1992; Tandler *et al.*, 1995a). Actualmente, pensa-se que além do perfil em HUFA, no caso da dourada, a quantidade de DHA e a relação entre DHA/EPA tem uma importância significativa no crescimento (Rodriguez *et al.*, 1997), existindo uma procura crescente de lípidos naturais de outras origens, altamente enriquecidos em EPA e principalmente DHA, como suplementos nutricionais durante o desenvolvimento larvar (Bell *et al.*, 1996; Mcevoy *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 1996).

Estes ácidos gordos são fornecidos através das presas que, como se referiu, têm de ser bioencapsuladas previamente com microalgas (Lee, 2003; Nery *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1979; Kissil & Koven, 1990), com emulsões lipídicas comerciais ou preparadas no próprio local (Watanabe *et al.*, 1983; Kissil & Koven,

1990; Pousão-Ferreira *et al.*, 1997b), ou com micropartículas ou microcápsulas (Gatesoupe & Robin *in Coves et al.*, 1989), durante algumas horas consoante o produto utilizado (Léger *et al.*, 1989; Nichols *et al.*, 1989; Rainuzzo *et al.*, 1989). Para além do seu perfil, quando se utilizam emulsões tem de se ter em atenção os fenómenos de oxidação que afectam a sua qualidade.

De qualquer modo, o perfil quer em EPA quer em DHA das larvas alimentadas com estas presas situa-se abaixo do perfil das larvas recém-eclodidas (Pousão-Ferreira *et al.*, 1997b; Tulli & Tibaldi, 1997), levando a uma contínua procura de novas fontes, com melhor perfil nestes ácidos gordos. Os ovos dos peixes marinhos apresentam grandes quantidades de HUFA da série *n*-3 pelo que deverão ser importantes quer no desenvolvimento embrionário quer nos primeiros estádios larvares (Cejas *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 1993). Na Figura 7 pode observar-se o perfil nos principais ácidos gordos e a relação DHA/EPA de ovos de sargo comum (*Diplodus sargus*) de dourada (*Sparus aurata*) e de linguado (*Solea senegalensis*).

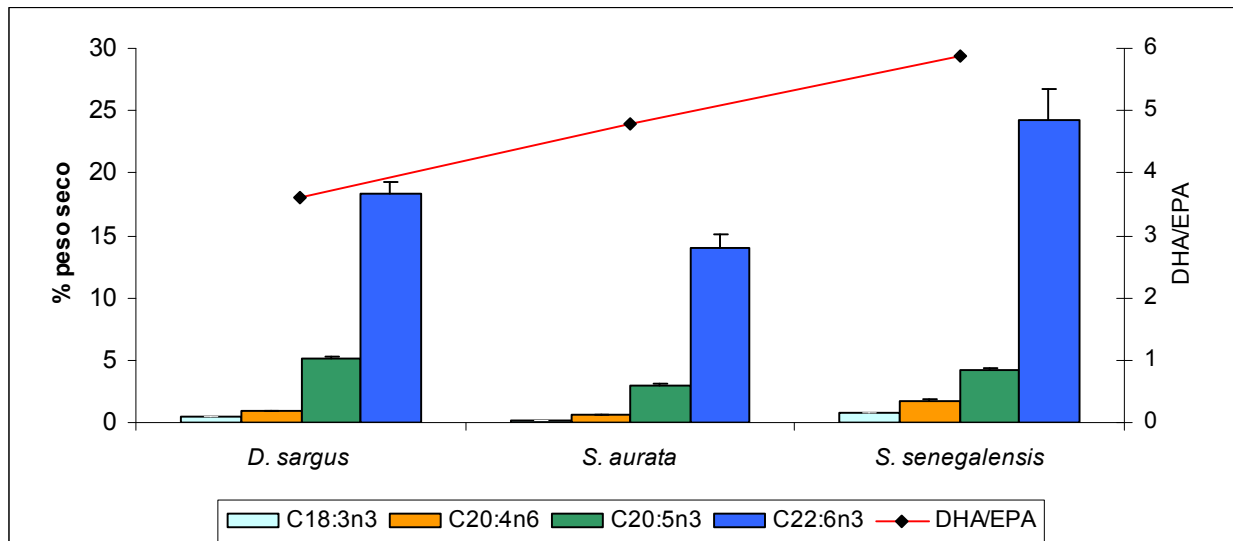


Figura 7 – Perfil lipídico de ovos de sargo comum (*D. sargus*), dourada (*S. aurata*) e linguado (*S. senegalensis*).

Verifica-se, assim que para o sucesso do cultivo das larvas de peixes marinhos é fundamental fornecer quantidades adequadas de ácidos gordos essenciais.

### Alimentação com inertes

A passagem a alimento inerte só é possível quando os alevins têm um comportamento alimentar em que se deslocam em direcção às partículas que entram na água consumindo-as quer na coluna de água quer no fundo. Nesta fase o alimento é distribuído "*ad libitum*", várias vezes ao dia. A passagem ao alimento inerte (geralmente designada por “desmame”), varia de acordo com a espécie e as técnicas de cultivo utilizadas, mas ocorre normalmente a partir do 20-30º DAE (Cahu & Infante, 1994; Gennari *et al.*, 1994; Gonçalves *et al.*, 1992; Person-Le Ruyet *et al.*, 1991; Pousão-Ferreira & Dinis, 1991; Pousão-Ferreira *et al.*, 2003). Existem alguns microencapsulados que permitem uma substituição parcial das presas vivas mas, como se referiu, a sua substituição total ainda se encontra em fase de desenvolvimento (Barnabe & Guissi, 1994; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Pousão-Ferreira *et al.*, 1996; Pousão-Ferreira *et al.*, 2003; Yúfera *et al.*, 2000). Numa fase posterior (a partir de 0.5-1g de peso individual), os granulados são fornecidos em função da temperatura, do peso individual dos peixes e do “stock” estabelecido no tanque.

Existem no mercado microencapsulados inertes e granulados com diferentes dimensões para serem utilizados de acordo com o crescimento dos peixes (dimensão da boca) e as suas necessidades nutricionais. São fornecidos com indicações de utilização, o que não dispensa a sua adaptação às especificidades de cada tanque ou mesmo da própria maternidade.

### d) Patologia e as malformações

Existem inúmeras patologias associadas ao cultivo larvar nomeadamente bacterioses (ex: *Vibrio* spp.), (Olafsen, 2001). Algumas das bacterias patogénicas são

transmitidas através da cadeia alimentar como se refere nos capítulos subsequentes.

Outros dos problemas que aparecem no cultivo larvar são as malformações esqueléticas, operculares e de migração do olho (peixes planos). Ainda que as causas deste problema não estejam completamente identificadas e a sua taxa de incidência seja muito variável, vários poderão ser os factores a ele associados. Assim poderão estar relacionados com:

- A nutrição, qualidade nutritiva das presas fornecidas (quantitativa e qualitativa nomeadamente em aminoácidos e em ácidos gordos de cadeia longa - HUFA);
- A disponibilidade de presas e seu valor nutricional ao longo do dia;
- O manuseamento dos ovos e larvas recém-eclodidas, as operações de limpeza (remoção da gordura e sifonagem dos tanques) ou os parâmetros de cultivo (circulação de água e arejamento entre outros);
- Outros factores, por exemplo, de ordem genética.

### **3) Períodos críticos**

Na dourada, após a reabsorção das reservas lipídicas, ou seja, entre o 4° e o 14° dia consoante as condições de cultivo, nomeadamente a temperatura, ocorrem perdas entre 20% e 90% da população (Barnabé *et al.*, 1976, Person-Le Ruyet & Verillaud, 1980; Divanach & Kentouri, 1990). Person-Le Ruyet & Verillaud (1980) indicam a existência de uma mortalidade em massa, entre o 10° e o 15° dia sem apontarem causas para tal. Também constatámos neste período, a morte por inanição de elevado número de larvas, cultivadas a 19°C (Pousão-Ferreira, comunicação pessoal). Segundo Tandler *et al.*, (1989), a elevada mortalidade nas primeiras 3 semanas (em larvas com 6-7 mm de comprimento) pode ser atribuída sobretudo a factores ambientais e nutricionais.

Existem vários períodos críticos ao longo de desenvolvimento larvar da dourada (Barnabé & Rene, 1973; Mazzola, 1985; Tandler *et al.*, 1989) que se podem definir do seguinte modo:

- O primeiro surge após a eclosão, entre o 3º e 9º DAE cuja mortalidade advém de malformações letais, podendo levar a um decréscimo de 10 a 15% do número inicial de indivíduos;
- O segundo período surge entre o 9º e 14º DAE, após a reabsorção das reservas vitelinas e início da alimentação exógena, podendo atingir uma mortalidade de 80%, sendo atribuída a factores nutricionais ou à não adaptação ao alimento exógeno;
- O terceiro período decorre do 18º ao 30º DAE, com uma perda estimada entre 20% a 40% a qual se manifesta por patologias associadas ao desenvolvimento da bexiga gasosa e canibalismo;
- O quarto período, do 30º ao 45º DAE é caracterizado por um comportamento agressivo cujas causas são atribuídas a uma má estratégia alimentar, densidade de cultivo elevada e a uma elevada heterogeneidade na estrutura dimensional da população, a qual levaria a uma predisposição das pós-larvas para o canibalismo. O canibalismo vai deste modo incidir sobre as larvas mais pequenas e enfraquecidas, as quais constituem um atractivo para as de maiores dimensões, habituadas a capturarem presas em movimento.

Estes períodos críticos afectam consideravelmente a percentagem de sobrevivência final. Neste sentido poderão sintetizar-se alguns aspectos que podem provocar elevadas mortalidades nas larvas após o consumo do saco vitelino (Ounais-Guschemann, 1989):

- Intensidade luminosa (iluminância) inadequada que não permita às larvas encontrar as presas,
- Fotoperíodo inadequado que não permita o tempo necessário para as larvas se alimentarem convenientemente,
- Hidrodinamismo acentuado, provocado pela entrada de água ou pelo arejamento, que arraste as larvas e as presas ou não permita uma correcta distribuição destas na água tornando difícil a sua captura,
- Densidade inadequada de presas ou dimensão incompatível com a boca das larvas. É fundamental uma boa distribuição das presas que permita a sua fácil localização pelas larvas e diminua o esforço de depredação

(Barahona-Fernandes, 1978). À medida que as larvas vão crescendo, deverão oferecer-se presas de maiores dimensões de modo a permitir um menor esforço de depredação para a mesma biomassa ingerida (Sorgeloos, 1995).



#### **4) Objectivos do manual**

Os objectivos principais deste manual são fundamentalmente dois.

- Por um lado focar as principais metodologias de produção da cadeia alimentar para larvas de peixes marinhos. Dividiu-se o trabalho em três capítulos. Um primeiro destinado à produção de microalgas, um segundo à produção de rotíferos (*Brachionus* spp.) e um terceiro à produção de Artémia (*Artemia* spp.).

Dentro de cada capítulo descrevem-se as espécies e as metodologias mais comuns da sua produção, incluindo os aspectos científicos e técnicos que as justificam.

- Por outro lado, tentar obter uma qualidade nutricional da cadeia alimentar adequada às necessidades nutricionais das larvas dos peixes marinhos no que respeita a ácidos gordos, com especial destaque para os altamente insaturados (HUFA) e particularmente EPA e DHA. Em cada um dos capítulos para além dos aspectos de produção referidos testaram-se metodologias que permitissem melhorar o perfil em HUFA do fitoplâncton e do zooplâncton.

No que se refere às microalgas foram testadas as cinco espécies mais utilizadas nas maternidades, de forma a verificar qual o modelo da sua produção que melhor vai ao encontro deste objectivos nutricionais.

Em relação ao zooplâncton, rotíferos e *Artemia* spp. verificou-se o seu perfil nutritivo em condições normais da sua produção e como se poderá alterá-lo, com vista incorporar a maior quantidade possível de HUFA.

Foram analisadas e testadas várias fonte lipídicas na bioencapsulação (enriquecimento) das presas com o objectivo de avaliar qual a incorporação final de ácidos gordos em relação ao alimento fornecido. Foram utilizados microalgas e diversos produtos emulsionados

preparados em laboratório (com óleos vegetais e de animais marinhos) e emulsionados comerciais.

Foram testadas diversos tempos de bioencapsulação com o objectivo de determinar a sua relação com a quantidade de ácidos gordos incorporados pelo zooplâncton. Como elemento de comparação utilizou-se o perfil em ácidos gordos dos ovos e das larvas recém-eclodidas, no pressuposto que contêm o perfil ideal para o seu normal desenvolvimento.

Foram também testadas condições de aplicação semelhantes aos dos tanques larvares no sentido de comparar o perfil em ácidos gordos do zooplâncton recém-bioencapsulado com o que normalmente se encontra nos tanques algumas horas após o seu fornecimento.

Com estes ensaios pretendeu-se contribuir para a gestão da bioencapsulação da cadeia alimentar no sentido de se encontrarem produtos e metodologias da sua utilização que permitam que as presas atinjam níveis de ácidos gordos compatíveis com as necessidades das larvas. Pretendeu-se também contribuir para um planeamento de fornecimento das presas aos tanques larvares de modo a manterem o máximo conteúdo que se conseguiu com a bioencapsulação.

## Referências bibliográficas

1. Barahona-Fernandes, M. H. & Girin, M., 1977. Effect of different food levels on the growth and survival of laboratory-reared sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax* (L.)). *Actes colloq. CNEXO*, 4: 69-84.
2. Barahona-Fernandes, M.H., 1978. L'élevage intensif des larves et des juveniles du bar (*Dicentrarchus labrax*): Données biologiques, zootechniques et pathologiques. These de Doctorat D'Etat Es-Sciences Naturelles. Université d'Aix-Marseille II, France: 208pp.
3. Barnabé, G. & Rene, F., 1973. Aquaculture marine. Reproduction contrôlée et production d'alevins chez la dorade *Sparus auratus*. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D*. 276:1621-1624.
4. Barnabé, G.; Bolineau-Coatanea, F.; Rene, F., 1976. Chronologie de la morphogenese chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.) (Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture*, 8: 351-363. Barnabe & Rene, 1976.
5. Barnabe, G. & Guissi, A., 1994. Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. *Aquacult. Fish. Manage.* 25 (5): 537-546.
6. Bell, M.V.; Mcevoy L.A. & Navarro, J.C., 1996. Deficit of didocosahexaenoyl phospholipid in the eyes of larval sea bass fed an essential fatty acid deficient diet. *Journal of Fish Biology.* 49(5):941-952.
7. Bell, J. G.; McEvoyb, L. A. Estevez, A.; Shieldsd, R.J. & Sargent, J. R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture.* 227: 211–220.
8. Bransden, M.P.; Cobcroft, J.M.; Battaglone, S.C.; Dunstan, G.A.; Nichols, P.D. & Bell, J. G., 2004. Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 241–256.

9. Bransden, M.P.; Butterfield, G. M.; Walden, J.; McEvoy, L. A. & Bell, J. G., 2005. Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 250 (2005) 328– 340.
10. Busch, A., 1996. Transition From Endogenous to Exogenous Nutrition - Larval Size Parameters Determining the Start Of External Feeding and Size Of Prey Ingested By Ruegen Spring Herring *Clupea harengus*. *Marine Ecology Progress Series* 130(1-3): 39-46.
11. Caggiano, M.; Canese, S.; Lupo, A. & Cirillo, A., 1993. Experiences of artificial reproduction and larval rearing of sheepshead bream (*Diplodus puntazzo*) in the south of Italy. *World Aquaculture '93 Int. Conf.*, Torremolinos (Spain), 26-28 May From Discovery to Commercialization. Carrillo, M.; Dahle, L.; Morales, J.; Sorgeloos, P.; Svennevig, N.; Wyban, J. eds. Oostende Belgium European Aquaculture Soc. 1993 no. 19 p. 326.
12. Cahu, C.L. & Infante, J.L.Z., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive Enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 109A (2): 213-222.
13. Cairrão, M. F.; Narciso, L.; Pousão-Ferreira, P. & Barahona-Fernandes, M. H., 1991. The biosynthesis capacity of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in cultured *Sparus aurata*: A hypothesis. *Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent (Belgium), 27-30 Aug 1991. LARVI'91. Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. Eds. *Europ. Aquac. Soc. Spec. Pub.* 15: 68-70.
14. Cejas, J.; Samper, M.; Jerez, S.; Fores, R. Y Villamandos, J., 1993. Perspectivas de cultivo de breca (*Pagellus erythrinus*) y sargo (*Diplodus sargus*); primeros resultados de crecimiento comparado con la dorada (*Sparus aurata*). *Actas IV Congreso Nac. Acuicult.*: 127-132.
15. Cejas, J. R.; Almansa, E.; Jerez, S.; Bolaños, A.; Felipe, B. & Lorenzo, A. 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 139: 209–216.

16. Chatain, B., 1991. Latest improvements in intensive seabass and seabream fry production: The french technique. *Larvi,91. Europ. Aquac. Soc. Spec. Pub.* 15: 382.
17. Chatain, B.; Ounais-Guschemann, N., 1991 - Determination of larval mass rearing standards in the sea bream *Sparus aurata*. *Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent (Belgium), 27-30 Aug 1991. LARVI' 91. Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. Eds. *Europ. Aquac. Soc. Spec. Pub* no.15: 314-315.
18. Coves, D.; Audineau, P.; Nicolas, J.L., 1989. Les Rotiferes - technologie d'elevage. Paris-France, Technique et Documentation Lavoisier 1989. pp. 225-240.
19. Divanach, P.; Kentouri, M., 1990. Larval rearing under extensive conditions. *In*: "Aquaculture vol.2", (Barnabe, G. ed.) : 820-832. Ellis Horwood, England.
20. Divanach, P.; Kentouri, M.; Charalambakis, G.; Pouget, F. and Sterioti, A., 1993. Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self feeders. *Eurp. Aqua. Soc. Special publication* 18: 285-297.
21. Estevez, A.; Planas, M. (1987). Produccion a gran escala de alevines de lubina (*Dicentrarchus labrax* (L. 1758) ) . *Inf. Tec. Inv. Pesq.*, 139.
22. Evjemo, J. O.; Reitan, K. I. & Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 227: 191–210.
23. Fernandez-Diaz, C.; Pascual, E.; Yúfera, M., 1994. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar.Biol.* 118(2): 323-328.
24. Fernandez-Diaz, C.; Yúfera, M., 1995. Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules. *Aquaculture* 134 (3-4): 269-278.
25. Gennari, -L.; Roncarati, -A.; Melotti, -P.; Loro, -F., 1994. Early weaning trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using different artificial diets. *Aquaculture* 124 (1-4): 283-284.

26. Goldan, O.; Popper, D. & Karplus, I., 1997. Management of size variation in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) .1. particle size and frequency of feeding dry and live food. *Aquaculture*, 152(1-4):181-190.
27. Gómez, A. G. & Ros, A. O., 1993. Revisión general del cultivo de nuevas especies piscícolas en el área mediterránea y experiencias realizadas en el centro oceanográfico de Murcia. *Inf. Téc. Inst. Esp.Ocean.* 14: 32.
28. Gonçalves, J., Dinis, M. T. & Pousão-Ferreira, P. 1992. Ensaios de adaptação a alimento inerte de larvas de dourada *Sparus aurata* L. *Sem. Aquac. Mediterrânica* 91. INIP Pub. Avulsas, nº19: 215-228.
29. Guillen, J. L.; Endo, M.; Turnbull, J.F.; Kawatsu, Hiroshi; Richards, R.H.& Aoki,-Takashi., 1993. Depressed growth rate and damage to the cartilage of red sea bream associated with exposure to ammonia. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59(7): 1231-1234.
30. Guillen, J. L.; Endo, M. & Kawatsu, H., 1994a. Ammonia toxicity to marine fish larvae for aquaculture purposes in southern Japan. *International Symposium on Aquatic Animal Health: Program and Abstracts*. Davis, CA., USA, Univ. Of California, School of Veterinary Medicine. W-15.6 (Summary only).
31. Guillen, J. L.; Endo, M.; Turnbull, J. F.; Kawatsu, H.; Richards, R. H. & Aoki, T., 1994b. Skin responses and mortalities in the larvae of Japanese croaker exposed to ammonia. *FISH.SCI.* 60( 5): 547-550.
32. Hamre, K; Morena, M.; Solbakken, J.; Opstad, I. & Pittman, K., 2005. The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 250: 555– 565.
33. Ibeas, C.; Izquierdo, M.S. & Lorenzo,A., 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127 (2-3): 177-188.
34. Ibeas, C.; Cejas, J.; Gomez,T.; Jerez, S. & Lorenzo,A., 1996. Influence Of Dietary N-3 Highly Unsaturated Fatty Acids Levels On Juvenile Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Growth and Tissue Fatty Acid Composition. *Aquaculture* 142 (3-4): 221-235.

35. Izquierdo, M.S.; Arakawa, T.; Takeuchi, T.; Haroun, R. & Watanabe, T., 1992. Effect of *n*-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105 (1): 73-82.
36. Izquierdo, M.S.; Watanabe, T.; Takeuchi, T.; Arakawa, T. & Kitajima, C.; 1996. Optimal EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). *The current status of fish nutrition in aquaculture. The proceedings of the third International Symposium on Feeding and nutrition in fish*. August 28 - september 1, 1989, Toba, Japan. Takeda, M.; Watanabe, T. -eds. 1990. pp. 221-232.
37. Izquierdo, M. S.; Socorro, J.; Arantzamendi, L. & Hernández-Cruz, C. M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 97–107.
38. Johnson, D. W. ; Katavic, I. 1986. Survival and growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae as influenced by temperature, salinity, and delayed initial feeding. *Aquaculture*, 52: 11-19.
39. Kanazawa, A. (1997) Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, 155: 129-134.
40. Kissil, G.W. & Koven, W.M., 1990. Preparation of oils, enhanced in highly unsaturated fatty acid (HUFA) content, by low temperature crystallization separation, for rotifer (*Brachionus plicatilis*) enrichment. *Aquaculture*, 88(1): 69-74.
41. Kolkovski, S.; Tandler, A. & Izquierdo, M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148 (4):313-322.
42. Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles -implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200:181–201.
43. Koven, W. M.; Kissil, G. W. & Tandler, A., 1989. Lipid and *n*-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79 (1-4): 185-191.
44. Koven, W. M., Tandler, A.; Kissil, G. Wm.; Sklan, D.; Friezlander, O. & Harel, M., 1990. The effect of dietary (*n*-3) polyunsaturated fatty acids on growth,

- survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91: 131-141.
45. Koven, W.M.; Tandler, A.; Kissil, G.Wm.& Sklan, D., 1992. The importance of *n*-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104 (1-2): 91-104.
46. Koven, W.M.; Tandler, A.; Sklan, D. & Kissil, G.W., 1993. The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different-age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture* 116 (1): 71-82.
47. Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S.; Ben-Atia, I.; Weiss, R.; Harel, M.; Behrens, P.; & Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4*n*-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*. 193: 107–122
48. Koven, W., 2003. Key factors influencing juvenile quality in mariculture: a review. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 55 (4): 283-297.
49. Le Milinaire, C., Gatesoupe, F. J. & Stephan, G., 1983. Approche du besoin quantitative en gras longs polyinsaturés de la série *n*-3 chez la larve de turbot (*Scophalmus maximus*). *C.R. Acad. Sci. Paris* 296: 917-920.
50. Lee, C-S., 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review *Aquaculture* 227:439–458.
51. Léger, Ph.; Grymonpré, D.; Van Ballaer, E. & Sorgeloos, P., 1989. Advances in the enrichment of rotifers and *Artemia* as food sources in marine larviculture. *EAS Spec. Publ.*, 10:141-142.
52. Lin, G., 1992. The toxicity of ammonia on the larvae of the bay scallop, *Argopecten irradians* *J. Shellfish Res.* 11 (1): 200-201.
53. Mcevoy, L.A.; Navarro, J.C.; Hontoria, F.; Amat, F. & Sargent, J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture*, 144 (4):339-352.
54. Mourente, G.; Rodriguez, A.; Tocher, D.R. & Sargent, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6*n*-3) on lipid and fatty acid



- compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112 (1): 79-98.
55. Mourente G. & Vazquez R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the senegal sole, *solea senegalensis* Kaup. *Fish Physiology & Biochemistry* 15(3):221-235.
56. Mourente, G., 2003. Accumulation of DHA (docosahexaenoic acid; 22:6n-3) in larval and juvenile fish brain. *The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference* pp.238-248.
57. Navarro, J. C.; McEvoy, L. A.; Bell, M. V.; Amat, F.; Hontoria, F. & Sargent, J. R., 1997. Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6w-3) on the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. *Aquaculture International* 5: 509–516.
58. Nery, F.; Narcisco, L. & Pousão-Ferreira, P., 1995. Fatty acid profile of *Brachionus plicatilis* for sea bream (*Sparus aurata*) larviculture. Mass Rearing of Juvenile Fish, Bergen (Norway), 21-23 Jun 1993. Mass Rearing of Juvenile Fish. Selected Papers From a Symposium Held in Bergen, 21-23-JUNE-1993. Pittman,-K.;Batty,-R.S.;Verreth,-J.-eds. 1995 vol. 2 pp.201.
59. Nichols, P.D.; Holdsworth, D.G.; Volkman, J.K.; Daintith, M.; Allanson, S., 1989. High incorporation of essential fatty acids by the rotifer *Brachionus plicatilis* fed on the prymnesiophyte alga *Pavlova lutheri*. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 40(6): 645-655.
60. Nichols, D.S.; Hart, P.; Nichols, P.D. & Mcmeekin, TA., 1996. Enrichment of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed an antarctic bacterium containing polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 147(1-2):115-125.
61. Olafsen, J. A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223–247.
62. Ostrowski, A.C. & Divakaran,S., 1990. Survival and bioconversion of n-3 fatty acids during early development of dolphin (*Coryphaena hippurus*) larvae fed oil-enriched rotifers. *Aquaculture* 89(3-4): 273-285.

63. Ounais-Guschemann, N., 1989 - Definition d'un modele d'elevage larvaire intensif pour la dourade, *Sparus auratus*. Tese Doutorado, Universidade D'Aix Marseille II, 184pp.
64. Perez, J.A.; Rodriguez, C.; Izquierdo, M.S.; Lorenzo, A. & Cejas, J.R., 1994. The effect of high dietary *n*-3 HUFA levels on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larval culture. *Aquaculture* 124 (1-4), p. 288.
65. Person-Le Ruyet, J. & P. Verillaud, 1980. Techniques d'elevage intensif de la Daurade doree *Sparus aurata* (L.) de la naissance a l'age de deux mois. *Aquaculture* 20: 351-370.
66. Person-Le Ruyet, J.; Fischer, C. & Thebaud, L., 1991. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) weaning and ongrowing onto Sevbar. 4th Int. Symp. Fish Nutrition and Feeding, Biarritz (France), 24-27 Jun 1991. Fish Nutrition in Practice. Kanshik, S.J.; Luquet, P.eds. Paris France Institut National De La Recherche Agronomique 1993 No. 61 pp. 623-628.
67. Person-Le Ruyet, J.; Alexandre, J.C.; Thebaud, L.; Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live Prey? *J. World Aquacult. Soc.* 24 (2): 211-224.
68. Person-Le Ruyet, J.; Galland, R.; Le Roux, A. & Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154: 155-171.
69. Pousão-Ferreira, P. & Dinis, M.T., 1991 - Aspectos da Produção em Piscicultura Marinha. 1<sup>st</sup> International Symposium - NOPROT 91, Faro 4-6 Abril 1991, 9 pp.
70. Pousão-Ferreira, P.; Dores, E.; Araújo, D. & Narciso, L., 1996. Rearing *Sparus aurata* larvae using inert diets: a new approach. *World Aquaculture'96*, Banckok, Tailandia: 375-376.
71. Pousão-Ferreira, P.; Dores, E. & Amaral, J., 1997a. White sea bream (*Diplodus sargus*) juvenile production: Perspectives for commercial aquaculture. *Island Aquaculture and Tropical Aquaculture*, EAS-WAS-CAA-ADA-ADAM. Martinique, May 4-9, 1997, *Short Communications and abstracts*: 241-242.

72. Pousão-Ferreira, P.; Dores, E.; Luis, O.; Passos, A. & Narciso, L. 1997b. Fatty acids profile of enriched *Brachionus plicatilis* on different commercial oils and emulsions for the sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Island Aquaculture and Tropical Aquaculture*, EAS-WAS-CAA-ADA-ADAM. Martinique, May 4-9, 1997, *Short Communications and abstracts*: 243-245.
73. Pousão-Ferreira, P.; Santos, P. J.; Carvalho, A. P.; Morais, S. & Narciso, L., 2003. Effect of an experimental microparticulate diet on the growth, survival and fatty acid profile of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture International* 11 (5):491-504.
74. Pousão-Ferreira, P.; Gonçalves, C.C. & Dores, E. 2005. Larval Rearing of Four Sparidae Species. *Book of Short Communications*. European Aquaculture Society. Special Publication, nº36. pp. 412-415. *Proceedings of Larvi 2005*. 4th Fish and Shellfish larviculture Symposium. Gent, Belgium, 5-8 Setembro 2005.
75. Rainuzzo, J.R.; Reitan, K.I. & Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*. 155: 103-115.
76. Rajkumar, M. & Kumaraguru Vasagam, K.P., 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 261: 649-658.
77. Robin, J.H. & Vincent, B., 2003. Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture*. 225: 463-474.
78. Rodriguez, C.; Perez, J. A.; Izquierdo, M. S.; Mora, J.; Lorenzo, A. & Fernandez-Palacios, H., 1993. Essential fatty acid requirements of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 295-304.
79. Rodriguez, C.; Perez, J.A.; Izquierdo, M.S.; Lorenzo, A. & Fernandez-Palacios, H., 1994a. The effect of *n*-3 HUFA proportions in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larval culture. *Aquaculture* 124 (1-4): pp.284.
80. Rodriguez, C.; Perez, J.A.; Izquierdo, M.S.; Mora, J.; Lorenzo, A. & Fernandez-Palacios, H., 1994b. Essential fatty acid requirements of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) . *Aquacult. Fish. Manage.* 25 (3): 295-304.

81. Rodriguez, C.; Perez, J.A.; Lorenzo, A.; Izquierdo, M.S. & Cejas, J.R., 1994c. *n*-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid . *Comp. Biochem. Physiol.* 107 (4): 693-698.
82. Rodriguez C.; Perez J. A.; Diaz, M.; Izquierdo, M. S.; Fernandez-Palacios, H. & Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture.* 150(1-2):77-89.
83. Salhi, M.; Izquierdo, M.S.; Hernandez-Cruz, C.M.; Gonzalez, M.; Fernandez-Palacios, H., 1994. Effect of lipid and *n*-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 124(1-4): 275-282.
84. Sargent, J.R.; Bell, J.G.; Bell, M.V.; Henderson, R.J. & Tocher, D.R., 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. *In*: "Aquaculture: Fundamental and Applied Research. Coastal and Estuarine Studies, 43", (Lahlou, B. & Vitiello, P. (Eds.), pp. 103-124. American Geophysical Union, Washington, D.C.
85. Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. *In*: "Broodstock management and egg and larval quality", (Bromage, N.R. & Roberts, R.J. Eds.), pp. 353-372. Blackwell Science Ltd.
86. Sargent, J.R.; McEvoy, L.A. & Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture.* 155: 117-127.
87. Silversand, C. & Norberg, B. & Haux, C., 1996. Fatty-Acid Composition Of Ovulated Eggs From Wild and Cultured Turbot (*Scophthalmus Maximus*) In Relation to Yolk and Oil Globule Lipids. *Marine Biology* 125(2): 269-278.
88. Sorgeloos, P., 1995. Live feeds and their substitution products for larval nutrition of fish, shrimp and prawn. *In*: Fifth International Course on Fish Larvae Nutrition, ERASMUS ICP-94/NL-1139/01, Wageningen, The Netherlands, May 1-9, 1995: IX- 1-34.
89. Stottrup, J. & Attramadal, Y., 1992. The influence of different rotifer and *Artemia* enrichment diets on growth, survival and pigmentation in turbot

- (*Scophthalmus maximus* L.) larvae". *Journal World Aquac. Soc.*, 23(4):307-316.
90. Takeuchi, T.; Masuda, R.; Ishizaki, Y.; Watanabe, T.; Kanematsu, M.; Imaizumi, K. & Tsukamoto K., 1996. Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Fisheries Science*, 62 (5):760-765.
91. Tandler, A.; Har'el, M.; Wilks, M.; Levinson, A.; Brickell, L.; Christie, S.; Avital, E. & Barr, Y., 1989. Effect of environmental temperature on survival growth and population structure in the mass rearing of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 78 (3-4): 277-284.
92. Tandler, A. & Kolkovski, S., 1991. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. *Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent (Belgium), 27-30 Aug 1991. LARVI' 91. Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. Eds. No.15 pp. 169-171.
93. Tandler, A. & Kolkovski, S., 1992. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful application of microdiets in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *ISR. J. Aquacult.-Bamidgeh.* 44(4): 128-129.
94. Tandler, A.; Anav, F.A; Choshniak, I., 1995a. The Effect of Salinity on Growth Rate, Survival and Swimbladder Inflation In Gilthead Seabream, *Sparus aurata*, Larvae. *Aquaculture.* 135 (4): 343-353.
95. Tocher, D.R. & Sargent, J.R., 1984 Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids*, 19(7): 492-499.
96. Tocher, D.R.; Mourente, G. & Sargent, J.R., 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture*, 148 (2-3):213-231.
97. Tulli, F. & Tibaldi, E., 1997. Changes in amino acids and essential fatty acids during early larval rearing of dentex. *Aquaculture International*, 5 (3):229-236.
98. Van Anholt, R.D.; Koven, W. M.; Lutzky, S. & Wendelaar Bonga, S. E., Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 238: 369–383.

99. Watanabe, T.; Oowa, F.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 44 (10): 1115-1121.
100. Watanabe, T.; Oowa, F.; Kitajima, C.; Fujita, S. & Yone, Y., 1979. Relationship between the dietary value of rotifers *Brachionus plicatilis* and their content of  $\omega$ 3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45 (7): 883-889.
101. Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34:115-143.
102. Weppe, M & Joassard, L., 1986. Preliminary study: Effects of light on swim-bladder's inflation of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Pathology in Marine Aquaculture*. PAMAQ1. Vivares, C.P.; Bonami, J. R.; Jaspers, E.-eds. 1986. no. 9 pp. 379-380.
103. Yúfera, M. & Pascual, E., 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina. *Informes Técnicos del Instituto de Investigación Pesquera*, 119: 3-27.
104. Yúfera, M.; Pascual, E.; Polo, A., 1991. The importance of prey sequencing during early growth of the gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Fish and Crustacean Larviculture Symp.*, Gent (Belgium), 27-30 Aug 1991. LARVI' 91. Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. Eds. no.15:116-118.
105. Yúfera, M.; Pascual, E.; Polo, A.; Sarasquete, M.C., 1993. Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169 (2): 259-272.
106. Yúfera, M.; Fernandez-Diaz, C. & Pascual, E., 1995. Feeding rates of gilthead seabream (*Sparus aurata*), larvae on microcapsules. *Aquaculture* 134 (3-4): 257-268.
107. Yúfera, M.; Sarasquete, M.C. & Fernandez Diaz, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Marine & Freshwater Research*. 47 (2):211-216.
108. Yúfera, M.; Fernandez Diaz, C.; Pascual, E.; Sarasquete, M.C.; Moyano, F. J., Días, M.; Alarcón, F. J.; García-Gallego, M. & Parra, G., 2000, Towards an

inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6:143-152.

109. Zhao, J.H.; Lam, T.J. & Guo, J.Y., 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H.Milne-Edwards, 1853 (Decapoda, Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquaculture Research*, 28(7): 517-525.

# CAPITULO I

## Fitoplâncton – microalgas

### Introdução

As microalgas são organismos unicelulares, planctónicos e autotróficos. São produtores primários, medindo entre 2µm e 100µm, e representam o primeiro elo da cadeia alimentar pelo que são produzidas como alimento directo para organismos filtradores. Nestes incluem-se os moluscos bivalves (amêijoia, ostra, etc) que são fitófagos durante todo o seu ciclo de vida, os primeiros estados larvares de crustáceos peneídeos (*ex: Melicertus (Penaeus) kerathurus, Litopenaeus (Penaeus) vannamei e Mersupenaeus (Penaeus) japonicus*), (Muller-Feuga, 2000; Yúfera & Lubian, 1990), e o zooplâncton utilizado na cultura larvar de peixes marinhos - *Brachionus plicatilis, Brachionus rotundiformis e Artemia spp.* (Becker, 2004; Yúfera & Pascual, 1984).

São também utilizadas, no caso do cultivo larvar da dourada e de novas espécies de esparídeos; sendo introduzidas nos tanques de desenvolvimento larvar, para produzir a chamada “água verde”, permitindo que rotíferos e *Artemia spp.* se alimentem, visto que o seu consumo pelas larvas vai sendo feito ao longo do dia, restando por vezes parte importante para o dia seguinte. Além disso contribuem para a estabilidade físico-química da água nomeadamente através do consumo de produtos azotados (Bedier *et al.*, 1984; Howell, 1973). Permitem também criar um ambiente mais propício para as larvas permitindo um melhor contraste das presas o que facilita a sua captura.

Existem vários métodos de cultivo de microalgas mas o mais comumente utilizado é baseado na indução artificial de condições eutróficas que levam a rápido desenvolvimento de explosões populacionais ("blooms"). Este método consiste na fertilização - adição de um inóculo puro e nutrientes ao meio de cultivo (água do mar filtrada e esterilizada).



Os grupos de microalgas mais vulgarmente cultivados são as diatomáceas e as microalgas verdes (De Pauw & Pruder, 1986). São utilizadas várias espécies de acordo com a sua dimensão e as necessidades nutricionais da espécie que as vai consumir e, neste sentido, os cultivos de microalgas são monoespecíficos. O isolamento de microalgas do meio natural é uma tarefa muito complexa pelo que as culturas puras são geralmente obtidas em algotecas de laboratórios especializados ou unidades de aquacultura que se dedicam ao seu isolamento. Existem várias técnicas para este efeito quer no que se refere ao isolamento das células quer à sua conservação, de acordo com as espécies em causa e o meio de onde foram extraídas (Andersen & Kawachi, 2005; Sieracki *et al.*, 2005).

Nas maternidades são normalmente produzidas em volumes de 2 a 400 litros (podem ser utilizados tanques de volumes superiores, 10-20 m<sup>3</sup>), em salas com ambiente controlado, onde o crescimento<sup>1</sup> exponencial da população é controlado, através de contagem microscópica das células num hematocítmetro (camãra de contagem) ou num contador de partículas (“Coulter counter”), permitindo fazer uma gestão correcta da produção.

Quando se utiliza um contador electrónico é necessário fazer a sua calibração de acordo com a espécie a contar. As culturas deverão ser previamente observadas ao microscópio porque a presença de partículas da mesma dimensão das células podem induzir em erros de contagem.

Por vezes efectuam-se cultivos mono ou poli-específicos (Yúfera *et al.*, 1984), ao ar livre, em tanques de grandes dimensões (500 a 10.000 m<sup>3</sup>), mas este método é pouco utilizado na Europa.

### Critérios de selecção das microalgas

A escolha das espécies a produzir é feita de acordo com as suas características biológicas, nutritivas e comportamento face aos métodos de

---

<sup>1</sup> O crescimento num organismo vivo é normalmente definido pelo incremento do número de células em organismos unicelulares ou pelo incremento da massa celular total para organismos multicelulares (Tomaselli, 2004).

produção utilizados. Entre os principais critérios de selecção podemos apontar os seguintes:

- Dimensões adequadas às exigências dos organismos consumidores;
- Elevado (e constante) valor nutritivo, de acordo com as exigências das larvas a que se destinam;
- Fácil digestão;
- Fáceis de cultivar, em sistemas não muito sofisticados;
- Crescimento rápido, atingindo e mantendo altas densidades (biomassa);
- Ciclo de vida curto e dominado em laboratório;
- Tolerância a variações dos factores ambientais;
- Ausência de produção de metabólitos tóxicos.

Em função destes critérios de selecção podemos estabelecer uma relação entre microalgas e consumidores (Becker, 2004; Dinis, 1994):

- Classe Bacillariophyceae (Diatomáceas) - são consumidas por moluscos bivalves, *Artemia* spp e larvas de crustáceos (por exemplo *Melicertus (Penaeus) kerathurus*, *Marsupenaeus (Penaeus) japonicus* e *Litopenaeus (Penaeus) vannamei*), devido à sua composição em silicatos, que constituem as frústulas das células, e que são necessários aos bivalves e crustáceos para formação das suas estruturas rígidas. São exemplos: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia closterium* e *Nitzschia paleacea*.

- Classe Haptophyceae (Flagelados) - são utilizadas como alimento para moluscos bivalves, rotíferos e *Artemia* spp. e como complemento de dieta em Crustáceos. São exemplos: *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso") e *Pavlova lutheri*.

- Classe Chlorophyceae – são algas verdes utilizadas para crescimento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) e do crustáceo *Artemia* spp. O seu teor em ácidos gordos polinsaturados de cadeia curta (PUFA - polyunsaturated fatty acids) é elevado (i.e., 16:3n-3; 18:3n-6 e 18:3n-3) e baixo nos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA - highly unsaturated fatty acids, ácidos gordos com 20 ou mais átomos de carbono e mais de três duplas ligações). Não apresentam EPA (20:5n-3) nem DHA (22:6n-3) (Brown, *et al*, 1997), pelo que não se utilizam para alimentar

presas destinadas a alimento para larvas de peixes marinhos. São exemplos *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella autotrophica*, *Nannochloris maculata*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertioleta*, *Tetraselmis suecica* e *Tetraselmis tetraethele*.

- Classe Eustigmatophyceae - pelas características nutritivas, geralmente com teor elevado em ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA), são ideais para alimento de larvas de crustáceos (devendo ser complementado o seu uso com *Baccilariophyceae*) e de presas (*Brachionus plicatilis* e *Artemia* spp.) para alimentar larvas de peixes marinhos (ex.: *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus* sp. e *Solea senegalensis*). São exemplos *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana* (Fig.1). As microalgas usualmente designadas por *Chlorella* marinha pertencem a esta classe (Mourente *et al.*, 1990).

Elevados teores em ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA) são indispensáveis às larvas dos peixes marinhos, nomeadamente 20:5n-3 e 22:6n-3. Nas microalgas encontramos o primeiro nas *Eustigmatophyceae* e o segundo nas *Haptophyceae*, pelo que estas algas são as mais utilizadas para estas larvas (Becker, 2004; Brown *et al.*, 1997). A utilização de uma mistura de *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis galbana* permite obter um valor relativamente elevado destes dois ácidos gordos (James *et al.*, 1989; Mourente *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1997).

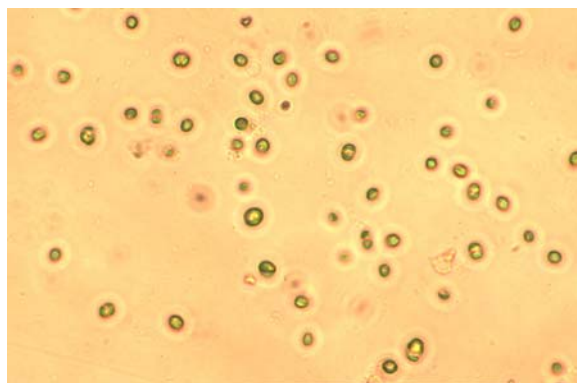


Figura 1 – Células de *Nannochloropsis gaditana* (diâmetro 2-5µm). Ampliação x 40.

De uma forma geral, cada espécie de microalga apresenta um perfil próprio em ácidos gordos pelo que devemos começar por seleccionar as que melhores perfis têm em função das necessidades nutricionais das espécies a que se destinam (Muller-Feuga *et al.*, 2003; Zhukova & Aizdaicher, 1995).

Também no caso de bivalves, como a amêijoia (*Ruditapes philippinarum*), a ostra (*Crassostrea gigas*) e a vieira (*Placopecten magellanicus*), o seu perfil em ácidos gordos polinsaturados parece estar relacionado com a espécie de microalga utilizada como alimento, que se reflecte na sua composição bioquímica e no seu crescimento e sobrevivência (Delaporte *et al.*, 2005; Hendriks *et al.*, 2003; Pernet &

Tremblay, 2004). No caso da amêijoia do báltico (*Macoma balthica*) os reprodutores alimentados com uma dieta suplementada em HUFA efectuaram posturas com um maior número de ovos por fêmea e com ovos de maiores dimensões (Hendriks *et al*, 2003).

Na tabela I compara-se o conteúdo do teor em ácidos gordos, em percentagem do peso seco, de três microalgas (Mourente *et al.*, 1990).

Tabela I - Conteúdo do teor em ácidos gordos, em % do peso seco, de três microalgas segundo Mourente *et al.*, 1990.

Ácidos gordos	<i>Chlorella autotrophica</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Isochrysis galbana</i>
16:2n-6	4,9	0,3	0,3
16:3n-3	15,2	1,3	0,4
18:2n-6	11,9	0,7	9,6
18:3n-3	24,3	0,2	7,1
20:4n-6	0,1	1,9	0,2
20:5n-3	0,1	17,2	0,8
22:6n-3	0,1	0,3	6,9
n-3/n-6	2,3	4,7	2
∑ HUFA	0,8	20,6	9,3

As principais espécies de microalgas utilizadas em aquacultura assim como as suas condições de cultivo e respectivas espécies utilizadoras são apresentadas na tabela II (adaptado de Noronha & Pousão-Ferreira, 1990; Becker, 2004; Dinis 1994).

Tabela II -Principais espécies de microalgas utilizadas em aquacultura.

Género/ Espécie	Dimensão ( $\mu\text{m}$ )	Cor	Mobilidade	Temp <sup>a</sup> . Ótima	Salinidade	Concent. Celular ( $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Espécies consumidoras
<i>Tetraselmis suecica</i>	6-7	verde	sim	20- 28°C	25-35	2-5	A; B; C; R
<i>Dunaliella tertioleta</i>	4-5	verde	sim	12- 30°C	-	2	A; B; R
<i>Chlorella spp.</i>	2-4	verde	não	<28°C	>5	50	A; R
<i>Nannochloropsis sp.</i>	1-4	verde	não	<28°C	5-35	50	A; C; Cp; R
<i>Isochrysis galbana</i>	3	castanha	sim	16- 20°C	10-35	5-15	A; B; C; R
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5	castanha	sim	18- 26°C	25-35	10-20	A; B; C
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	4-5	castanha	não	25- 30°C	25-35	5	A; B; C
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	12-40	castanha	não	-	-	-	B; C
<i>Skeletonema costatum</i>	5-8 forma uma cadeia	castanha	não	10- 27°C	<30	3	B; C

A- *Artemia* spp.; B- Bivalves; C- Outros crustáceos; Cp – Copépodes; R- Rotíferos.

Assinala-se que a velocidade de crescimento e a concentração final obtidas varia de acordo com os parâmetros ambientais e a disponibilidade em nutrientes

## Metodologia de produção

Este tipo de cultivo de microalgas divide-se em duas fases:

- Preparação e manutenção dos inóculos (“stocks”) puros;
- Produção em médios e grandes volumes.

A produção de microalgas baseia-se, normalmente, no método dos volumes limitados (“batch”): o volume final é igual ao inicial, não se acrescentando nunca meio novo. As culturas são iniciadas após a adição de nutrientes ao meio de cultivo (água salgada), sendo o balão ou manga cheios com água do mar filtrada e com um inóculo concentrado, na razão de 5% a 10% do volume total. Após o período de crescimento utiliza-se a cultura na sua totalidade, quando a concentração desejada é atingida, permitindo obter altas concentrações de células num espaço limitado. Este método, além de fácil execução, minimiza os riscos de contaminação.

A quantidade e tipo de meio nutritivo utilizado deve ser adaptado à espécie em causa (meios nutritivos nos anexo I, II e III) e às condições de cultivo. Para a mesma espécie, o tipo de meio utilizado, a idade dos cultivos, o fotoperíodo e a iluminância, poderão alterar o seu perfil nutritivo nomeadamente o perfil em ácidos gordos (Fabregas *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1997; Narciso *et al.*, 1996; Narciso *et al.*, 1998; Tonon *et al.*, 2002; Tzovenis *et al.*, 2003). Quando trabalhamos com espécies provenientes de outros locais temos de ter em conta os parâmetros abióticos em que normalmente se desenvolvem (Renaud *et al.*, 2002).

As culturas são mantidas em salas próprias, termicamente isoladas e refrigeradas, com equipamento de esterilização (por lâmpadas de radiação ultravioleta) com o objectivo de reduzir as populações microbianas. Normalmente existe uma pequena sala ou câmara frigorífica para a manutenção de inóculos e das primeiras fases de produção (balões), um laboratório para repicagens, inoculações e preparação de nutrientes e uma sala de maiores dimensões para cultivos em grandes volumes (mangas ou tubos de acrílico).

O acesso à sala das culturas inóculo é normalmente feito a partir do laboratório de repicagens ou da sala de produção de grandes volumes, evitando-se a entrada directa nesta área o que diminui os riscos de contaminações.

## Condições de cultivo

### Parâmetros físico-químicos

- Iluminância – A quantidade de luz (lux), o espectro luminoso (temperatura de cor) e o fotoperíodo são essenciais para o crescimento das microalgas visto a luz ser a fonte de energia necessária à realização da fotossíntese.
- Arejamento – O arejamento de um cultivo de microalgas é essencial para manter as células em suspensão evitando a sua sedimentação, permitir que as células sejam expostas à luz (isto é tanto mais importante quanto a profundidade ou espessura do volume de cultivo), evitar estratificação térmica em tanques de grande volume, manter os nutrientes uniformemente distribuídos e favorecer as trocas gasosas com o ar ambiente fornecendo CO<sub>2</sub>. Certas espécies poderão não tolerar o arejamento demasiado forte como o caso de *Tetraselmis suecica* que perde os flagelos e para de crescer (Muller-Feuga *et al*, 2003).
- Temperatura - A maioria das microalgas que utilizamos crescem entre 18°C e 24°C, com uma temperatura ideal próximas dos 20°C (Tabela II).
- pH - O pH deve situar-se entre 7,5 e 9, mas com um ideal próximo do 8-8,5. O pH tem tendência para aumentar com a concentração e a idade do cultivo, devido ao consumo do CO<sub>2</sub> por parte das microalgas, tornando-se limitante para o crescimento das células. Neste caso utiliza-se CO<sub>2</sub> adicional para o manter dentro dos limites referidos.
- Salinidade – As microalgas que utilizamos crescem normalmente à salinidade da água do mar 35-38 mas são tolerantes a salinidades mais baixas (Tabela II).

### Infraestruturas

- Salas - Estas são utilizadas exclusivamente para o cultivo de microalgas, com temperatura entre 18 e 20 °C; iluminação por lâmpadas fluorescentes (de preferência com balastro electrónico que tem melhor rendimento e menor libertação de calor), em calha estanque, de potência e dimensão adequadas, dispostas verticalmente ao longo das mangas de polietileno ou tubos de acrílico ou fibra de vidro.
- Laboratório - equipado com bancadas, lava loiça, armários e outras estruturas.

### Equipamentos

- Ar condicionado ou compressor de frio com difusor e filtro de ar, frigorífico, autoclave, estufa e ou micro-ondas para esterilização, balança de precisão (0,001 g), destilador e desmineralizador, máquina de lavar loiça, microscópio com contraste de fase e ocular com retículo micrométrico, hematocítmetro (câmara de contagem), placa de aquecimento, bico de Bunsen, agitador de tubos, equipamento de filtração e esterilização da água salgada proveniente das condutas da instalação, electrobomba submersível para transferência das microalgas para os tanques de zooplâncton e das larvas, etc.

### Outros

- Vidraria geral - tubos de ensaio, “Erlenmeyers”, balões, funis, copos graduados, provetas, pipetas graduadas, pipetas de Pasteur.
- Algodão cardado, rolhas de borracha, papel para autoclavar material e papel de alumínio.



## Manutenção de inóculos (pequenos volumes)

A produção de microalgas é iniciada a partir de culturas inóculo ("stock"), que representam a fase asséptica do cultivo. O seu objectivo é conservar as várias estirpes de modo a garantir o abastecimento regular da produção com culturas puras e fornecer continuamente inóculos para os grandes volumes de produção.

As espécies a manter e o número de replicados por espécie deverá estar de acordo com o planeamento da produção. Poderão conservar-se espécies em tubo de ensaio para utilização em outras épocas do ano.

As culturas para inóculo (Fig. 2) são mantidas em pequenos volumes (tubos de ensaio) ou em meio sólido (em caixa de Petri), guardadas em câmaras frigoríficas ou salas com temperatura controlada e em condições de esterilidade, utilizando lâmpadas de radiação ultravioleta ou possuindo uma câmara de fluxo laminar onde se fazem as repicagens.

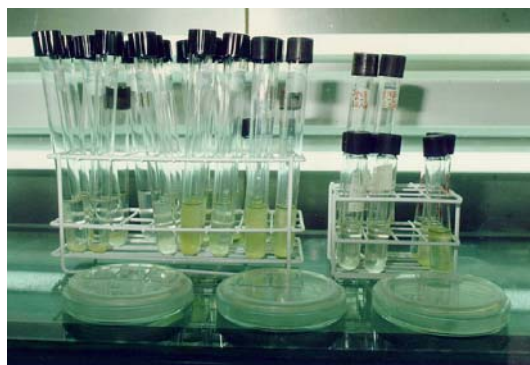


Figura 2 – Inoculos em tubos de ensaio e caixas de Petri.

O crescimento de uma microalga é caracterizado por cinco fases (Fig.3):

1- Fase de latência ou fase lag, correspondente à fase de adaptação às condições do meio. A sua duração depende da concentração e estado fisiológico do inoculo.

2 - Fase exponencial, após a adaptação corresponde ao máximo de multiplicação celular e de crescimento exponencial ou logarítmico do número de células. A cultura é composta por células jovens e

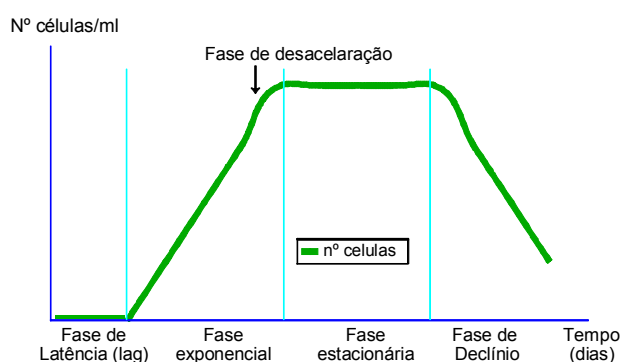


Figura 3 – Fases de crescimento de uma microalga.

ainda bioquimicamente mais ricas em proteínas que em lípidos.

O crescimento celular nesta fase pode aumentar em função do tempo de acordo com a função logarítmica

$$C_t = C_0 \cdot e^{mt}$$

em que  $C_t$  e  $C_0$  representam a concentração celular no tempo  $t$  e  $0$  e  $m$  a curva de crescimento específico.

3 - Fase de desaceleração, corresponde a uma fase imediatamente anterior à fase estacionária, em que devido a diversos factores limitantes, como a diminuição dos nutrientes ou o aumento do pH, a divisão celular começa a diminuir.

4 - Fase estacionária, corresponde à concentração máxima atingida pela microalga e que permanecerá assim até se esgotarem os nutrientes. Esta fase tem durações substancialmente diferentes de espécie para espécie. A multiplicação celular nesta fase é diminuta. Fase em que deve ser fornecida como alimento e que corresponde ao conteúdo máximo em lípidos.

5 - Fase de decréscimo ou declínio, após o consumo total dos nutrientes, a reprodução cessa e a cultura envelhece acabando por morrer. A sua qualidade nutritiva diminui bastante nesta fase pelo que não deve ser utilizada como alimento.

#### a) Culturas de inóculo em meio líquido

As culturas de inóculo são mantidas em tubos de ensaio de 40 mL e "Erlenmeyers" de 250 mL, sem arejamento, contendo meio de cultura, constituído por água do mar filtrada e esterilizada por autoclavagem (20 a 40 minutos a 120°C e 20psi) e enriquecida com uma solução nutritiva (ex: meio de Walne - anexo II). Esta é constituída por sais, fosfatos, vitaminas e silicatos (no caso das diatomáceas para a formação da sua "concha" externa - frústula). No máximo mensalmente, ou de acordo com as necessidades e o estado da cultura, efectuam-se repicagens. Estas são efectuadas a partir de tubos de ensaios para novos tubos de ensaios e para "erlenmeyers" de modo a garantir a continuidade da renovação dos "stocks" e da produção de inóculos. Regularmente iniciam-se os tubos de ensaio a partir de

inóculos de segurança em caixa de Petri (culturas em meio sólido), (Fig.4).

Estes "stocks" deverão ser mantidos em boas condições, devendo ser repicadas enquanto as células estão novas e com um bom potencial de multiplicação (em fase de crescimento exponencial).

Estas culturas são de manutenção e poderá não interessar que o seu crescimento seja rápido pelo que se iniciam com pouco inóculo - tubos de ensaio de 1 mL e

"Erlenmeyers" de 6 mL de inóculo puro - e uma iluminância de 500-1000 lux, consoante a necessidade de crescimento.

As culturas são mantidas numa sala climatizada (18-20 °C), sob iluminação contínua, com uma iluminância de 1.000-2.000 lux, sendo agitadas ligeiramente todos os dias, manualmente ou com um agitador eléctrico. Regularmente o número de células da cultura é contada numa câmara de contagem (hematocitómetro), (Fig. 5), sendo a câmara de Burker (Fig. 6) uma das mais vulgarmente utilizadas tal como a Câmara de Neubauer (ver procedimentos nos anexos V e VI), e quando estão suficientemente desenvolvidas os tubos de ensaio constituem o inóculo para novos tubos e para "Erlenmeyers" de 250 mL. Dos precedentes deve-se guardar pelo menos um tubo até que se verifique que as novas culturas se estão a desenvolver bem, sem contaminações. Nestas culturas não se utiliza arejamento e devem estar tapadas com uma rolha de borracha (previamente autoclavada) ou algodão cardado.

Com o objectivo de evitar contaminações deve ser observado o máximo de assepsia, utilizando-se sempre material esterilizado. Os tubos de ensaio cheios com água salgada e nutrientes, excepto as vitaminas, são autoclavados, deixando-se

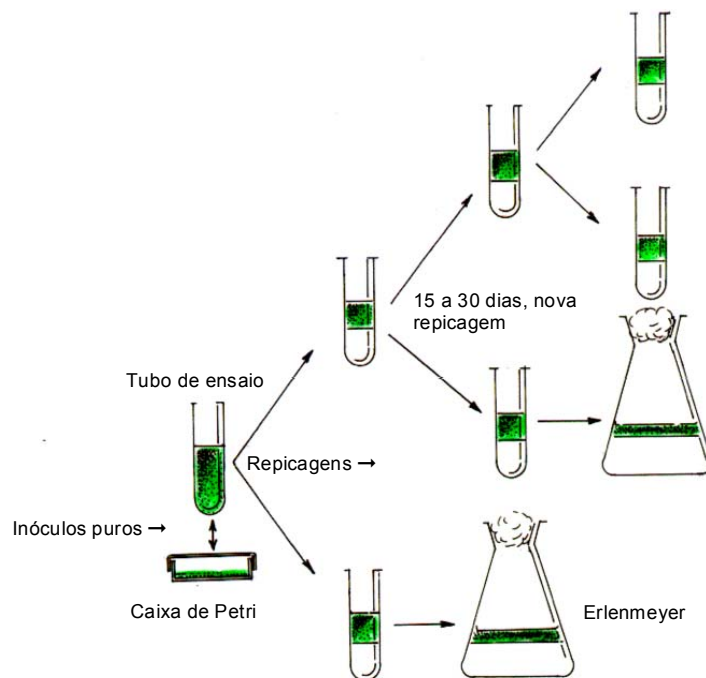


Figura 4 - Esquema da repicagem de inóculos.  
(Desenho de J.J.Sá e Silva).

tapados até arrefecerem completamente, antes de juntar as vitaminas e a microalga.

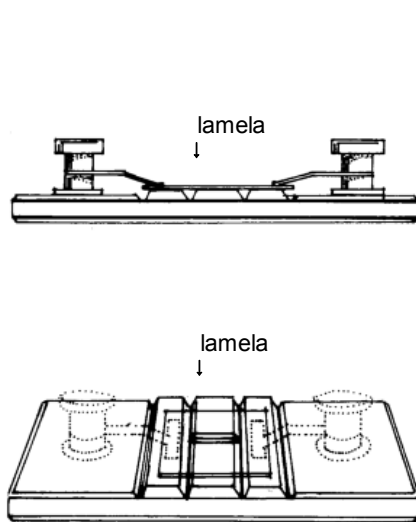
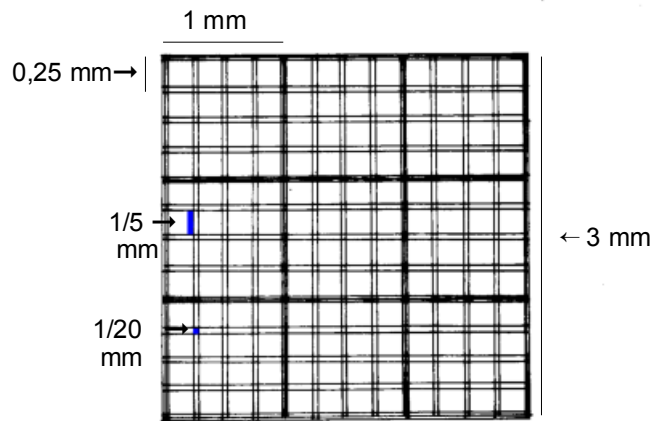


Figura 5 – Hematocitómetro. (desenho de J.J. Sá e Silva).



Quadrado médio - nº quadrados  $X1/5/1/5 \times 1/10 =$  nº células

Quadrados pequenos - nº quadrados  $X1/20 \times 1/20 \times 1/10 =$  nº células

Faz-se a leitura dos quadrados nas filas: 1, 3, 7 e 12 (de modo a ser aleatória).

Figura 6 – Reticulado da Câmara de Burkler. (desenho de J.J. Sá e Silva).

O mesmo processo é utilizado para todo o equipamento que é autoclavado (20 a 40 minutos a 121°C e 1,4 atm) ou esterilizado na estufa a 150°C durante 2 horas. Enquanto se procede às inoculações toda a bancada e restante equipamento deve estar limpo, utilizando-se um bico de Bunsen para esterilização dos equipamentos e bocas dos tubos à medida que se vai trabalhando (Fig. 7).

Devido à possibilidade de contaminação a que os stocks estão sujeitos, é sempre aconselhável a sua diversificação. Em geral por cada espécie, por segurança, devem manter-se no mínimo três stocks de duas ou três espécies de características biológicas diferentes, em termos

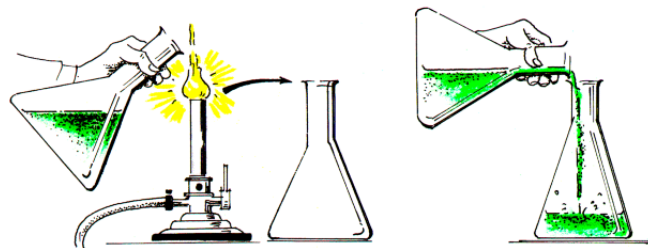


Figura 7 – Desinfecção da boca do Erlenmeyer (Desenho de J.J. Sá e Silva).

de velocidade de crescimento, temperatura, salinidade, sedimentação e qualidade nutritiva, que possam ser utilizadas como substituto em caso de problemas com a espécie que estamos a utilizar. A espécie e a data de inoculação deverão estar bem visíveis nos tubos e “Erlenmeyers”.

#### b) Culturas "stock" em meio sólido

Para maior segurança e no caso de eventuais contaminações devido a bactérias, protozoários heterotróficos ou outras espécies de microalgas, efectua-se periodicamente culturas em meio sólido, semelhantes às utilizadas para bacteriologia (em caixas de Petri). Este meio é constituído por água do mar esterilizada, enriquecida com meio de Walne (anexo II), e solidificado com 2% de agar (anexo IV). A incubação das placas é feita sob iluminação contínua. As placas obtidas são depois mantidas a baixas temperaturas (frigorífico). Mantêm-se em boas condições de seis meses a um ano, consoante a espécie, após o que são repicadas novamente.

Este método permite:

- obter culturas monoespecíficas, após repicagens sucessivas,
- purificar as culturas "stock" quando se apresentam contaminadas,
- manter as culturas "stock" em boas condições por períodos de tempo relativamente longos, podendo ser repicadas quando necessário.

Poderão ser utilizados outros métodos complementares com a filtração, a utilização de ultra-sons, a agitação com vortex, a centrifugação, a utilização de micropipetas, a radiação ultra-violeta e antibióticos (Guillard, 2005).

#### **Optimização da produção de inóculos**

Todas as culturas devem ser iniciadas a partir de inóculos bem concentrados, mas ainda em fase de crescimento (fase de declínio relativo do crescimento - desaceleração). Deste modo evita-se o aparecimento duma fase *lag* (latência ou adaptação), que surge em culturas jovens mas pouco concentradas, assim como de

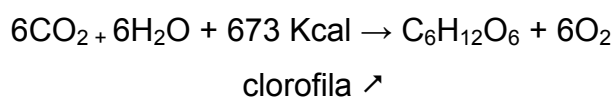
uma fase de declínio (decréscimo) que pode surgir em culturas concentradas mas já velhas. A concentração e a qualidade das culturas, são assim dois factores importantes a ter em conta na produção de inóculos para grandes volumes, deles dependendo também a obtenção num mínimo de tempo, dum máximo de biomassa.

Como as necessidades em microalgas se expressam em número de células/mL<sup>-1</sup>, existe a necessidade de obter uma maior concentração possível de modo a rentabilizar o espaço disponível.

A velocidade de crescimento vai depender de:

- características biológicas da espécie;
- concentração, volume e estado fisiológico das células do inóculo inicial;
- iluminância adequada e fotoperíodo;
- disponibilidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>);
- manutenção dos parâmetros ambientais de acordo com a espécie (ex: temperatura e salinidade);
- nutrientes (meio de cultura) utilizados e sua concentração.

O ar fornecido pelo arejamento contém 0,03% de CO<sub>2</sub> o que poderá ser limitante quando se atingem grandes concentrações celulares. Ao contrário do que acontece com as plantas terrestres, o CO<sub>2</sub> atmosférico não satisfaz as necessidades em Carbono (C) dos sistemas de produção de microalgas em grandes densidades (Grobbelaar, 2004). Deste modo, quando a concentração celular aumenta, o CO<sub>2</sub> do meio desce e o pH aumenta. Este aumento provoca alterações na química dos metais vestigiais (Sunda *et al.*, 2005). Assim, o fornecimento de CO<sub>2</sub> adicional é de extrema importância para aumentarmos as concentrações e rentabilizarmos o espaço utilizado. O CO<sub>2</sub> permite regular o pH do meio, reagindo com a água formando-se ácido carbónico que se ioniza dando hidrogenocarbonato que estabiliza o pH, (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> → H<sup>+</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). É também uma importante fonte de carbono para a fotossíntese. A síntese de uma molécula de glucose pressupõe a captação de 673 Kcal de energia (Amat, 1985a):



A deficiência de CO<sub>2</sub> na água leva ao aumento do pH. Com valores de pH superiores a 8 dá-se a precipitação do fósforo, transformando este micronutriente num factor limitante para as microalgas. Por outro lado, amónia converte-se em amoníaco que é tóxico (Amat, 1985b).

Ensaio feitos com *Nannochloropsis* sp. indicam que o fornecimento de CO<sub>2</sub> conjuntamente com o ar, e a sua disponibilidade no meio, aumenta o conteúdo em EPA desta microalga (Hoshida *et al.*, 2005; Hu & Gao, 2003, Roncarati *et al.*, 2004).

Na figura 8 mostra-se o aspecto da concentração de *Nannochloropsis oculata* com utilização de CO<sub>2</sub> adicional (mais escuro) e sem CO<sub>2</sub> adicional (mais claro).

O tipo de nutrientes e a sua concentração permite obter diferentes velocidades de crescimento e diferentes concentrações finais para as mesmas espécies (Herrero *et al.*, 1991). O perfil em ácidos gordos também parece ser afectado com o tipo de nutrientes, a quantidade de nutrientes e com a idade do cultivo (fase de crescimento) (Carvalho *et al.*, 2006; Peña & Villegas, 2005; Poisson & Ergon, 2001; Meiser *et al.*, 2004; Roncarati *et al.*, 2004).

Os nutrientes minerais mais importantes (Grobbelaar, 2004) são o carbono (reforçado com CO<sub>2</sub> como descrito), o azoto fornecido normalmente na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o fósforo fornecido normalmente na forma de ortofosfato (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e outros macro e micro-nutrientes como se poderá observar nos anexos I, II e III.

Para além dos nutrientes, as condições ambientais, nomeadamente o fotoperíodo e a iluminância, são outros factores que contribuem quer para a concentração celular quer para o perfil lipídico (Carvalho & Malcata, 2005; Çelekli. & Donmez, 2006; Fábregas *et al.*, 2002; Lafarga-De la Cruz *et al.*, 2006; Leonardos & Lucas, 2000; Liang *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2003; Sandnes *et al.*, 2005; Tzovenis *et al.*, 2003;).

Em relação à iluminância, que é um factor da maior importância no crescimento e produtividade - existe uma relação directa entre a quantidade de luz e a



Figura 8 – Crescimento de *Nannochloropsis oculata*, respectivamente, com e sem utilização de 1% de CO<sub>2</sub> juntamente com o arejamento.

fotossíntese - uma sobre-exposição à luz poderá ser inibidor do crescimento celular, processo denominado foto-inibição (Masojídek *et al.*, 2004; Richmond, 2004; Vonshak & Torzillo, 2004).

## **Produção em grande escala**

Esta fase do cultivo pode ser feita:

- dentro de salas – em que se controla a temperatura, a iluminação e a assepsia envolvente.
- em estufas – em zonas e/ou épocas do ano em que as condições climatéricas o permitam, neste caso o controlo dos parâmetros anteriores é mais difícil mas o custo da infra-estrutura substancialmente inferior.
- ao ar livre – em zonas e/ou épocas do ano em que as condições climatéricas o permitam, neste caso em tanques em que se conseguem grandes volumes de produção mas com mais dificuldade em controlar o crescimento e as contaminações.

Podemos classificar a produção, conforme a metodologia empregue em:

- Cultivo sem reposição – “batch” – em que se inocula uma manga ou tanque, previamente desinfectado e preparado com água e os nutrientes, e que após se atingir o crescimento celular pretendido se utiliza na totalidade. Este é o sistema que utilizamos e que descrevemos para as várias fases de produção.
- Cultivo em contínuo – em que se fornece uma determinada quantidade de água salgada filtrada e esterilizada com nutrientes ao meio (ex: tanque) permitindo manter a concentração celular e utilizar a quantidade equivalente à água que se vai repondo. Este método é mais complicado de utilizar porque implica um controlo apertado da concentração celular e da quantidade de água e nutrientes a adicionar.
- Cultivo em semi-contínuo – em que periodicamente se retira parte do cultivo concentrado e se repõe o volume com água salgada filtrada e esterilizada com nutrientes ao meio. Este método é essencialmente utilizado em tanques.



Permite uma maior, e mais económica, produção mas é difícil de controlar podendo surgir contaminações a qualquer momento.

A fase de produção tem por objectivo o cultivo de volumes sucessivamente maiores a fim de cobrir as necessidades de utilização. Obtêm-se através de repicagens sucessivas, partindo-se dos pequenos volumes, com os quais se inoculam volumes cada vez maiores, normalmente iniciando-se com 5% a 10% do volume final.

As culturas são controladas qualitativamente pois se houver contaminação não há crescimento, e quantitativamente identificando as fases da sua curva de crescimento, para determinar quando deverão ser utilizadas.

Cultivo sem reposição – “batch”. Como referimos utilizamos este método de cultivo, que se efectua em salas devidamente equipadas com iluminação com lâmpadas fluorescente - tipo "daylight" e " grolux" intercaladas - devido ao seu baixo consumo energético. A iluminância utilizada varia com a espécie situando-se entre os 3.000 lux e 6.000 lux. Para volumes muito grandes é necessária uma iluminância maior (ex. 10.000 lux) de modo a que a luz alcance todas as células. Paralelamente é necessário manter as células em suspensão (através de arejamento ou de meio mecânicos) de modo a evitar sobre-exposição de parte das células e sub-exposição de outra parte. O fotoperíodo tem uma fotofase de 24 horas de modo a incrementar a velocidade de crescimento (fotossíntese). As condições de cultivo (temperatura, salinidade, intensidade luminosa e fotoperíodo) devem manter-se constantes ao longo de todo o período de crescimento.

#### a) Volumes intermédios

Os "Erlenmeyers" de 250 mL (Fig. 9) são usados como inóculos para "Erlenmeyers" de 2 litros, que são autoclavados contendo meio de cultura e os nutrientes, à excepção das vitaminas que seriam destruídas pelo calor. Com estas culturas, quando suficientemente desenvolvidas, inoculam-se balões de 6 e/ou 10 litros de capacidade.

Estes, por sua vez são usados como inóculos para os grandes volumes de produção (mangas e tubos de PVC (plástico) transparente ou fibra), e para a manutenção das culturas inóculo ("stock") de rotíferos. Quando o consumo de microalgas é reduzido poderão ser utilizados como volume final. Por vezes, em casos de grande consumo, utilizam-se tubos de plástico acrílico transparente, de 60 litros de volume, como inóculo intermédio.

São inoculados a partir de balões e servem para iniciar grandes volumes (mangas de 400 litros ou tanques), (Figs. 10, 11, 12 e 13).



Fig. 9 – Erlenmeyers de 250 mL



Figura 10 – Câmara refrigerada de manutenção de inóculos de microalgas.



Figura 11 – Sala de manutenção de inóculos de microalgas.



Figura 12 – Sala de manutenção de inóculos de microalgas. Tubos de ensaio (40 mL), erlenmeyers (250mL e 2 L) e balões (10L).

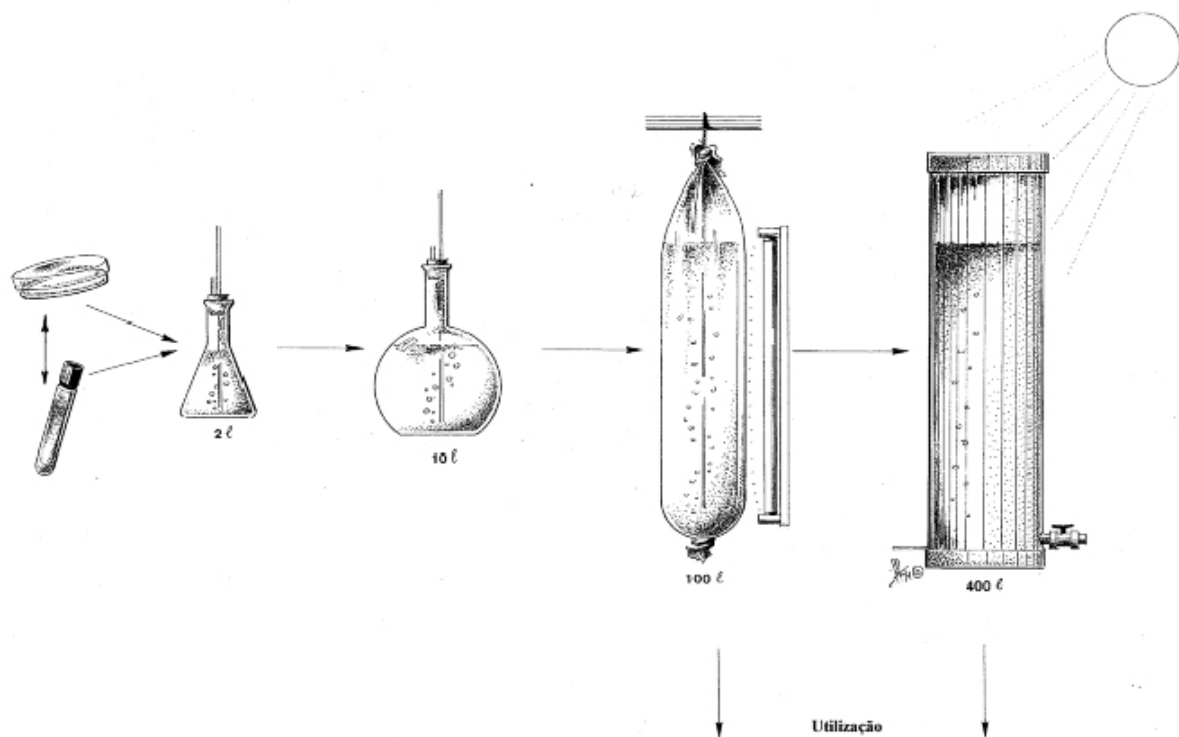


Figura 13 – Esquema de produção de microalgas (desenho de J.J.Sá e Silva).

A água utilizada nos balões e mangas é esterilizada com hipoclorito de sódio ( $1\text{mL.L}^{-1}$ ) sendo este neutralizado, após um mínimo de duas horas, com uma solução de tiosulfato de sódio em concentração de acordo com a graduação do hipoclorito. Normalmente, utiliza-se  $1\text{mL.L}^{-1}$  de uma solução de 150g de tiosulfato de sódio por litro de água destilada. Convém no entanto confirmar a neutralização para o que poderá ser utilizada a *o*-tolidina. Quando se introduzem algumas gotas de *o*-tolidina ou outro indicador de cloro activo na água, estas tornam-se amarelas ou de outra cor de acordo com o produto utilizado, se existirem restos de hipoclorito de sódio. Outra forma prática de detectar a presença de lixívia na água é a utilização de um “kit” para determinação de cloro em piscinas.

Após a neutralização são introduzidos os nutrientes e o inóculo de microalga.

Todas as culturas a partir do volume de 2 litros recebem arejamento contínuo, mantendo as células em suspensão e garantindo o fornecimento do dióxido de carbono necessário às microalgas e permitindo deste modo atingir concentrações celulares mais elevadas. A suspensão criada pelo arejamento permite uma exposição à luz e aos nutrientes de todas as células e evita a estratificação térmica

do meio no caso de cultivos ao ar livre. Quando necessário, utiliza-se uma mistura de ar atmosférico com CO<sub>2</sub> a cerca de 1-2%, feita na canalização de distribuição de ar.

Quando se inoculam "Erlenmeyers" de 2 litros a partir de culturas de 250 mL, o arejamento só é colocado de forma gradual após se verificar ter havido desenvolvimento inicial.

### b) Grandes volumes

Por grandes volumes entende-se toda a produção de microalgas efectuada em:

- mangas de polietileno: 80, 160 e 400 litros,
- mangas rígidas (cilindros) de PVC ou fibra de vidro: 250 e 400 litros.

Estas culturas são inoculadas a partir de balões de 10 litros ou de tubo de acrílico (Fig.14), bem concentrados. As mangas de polietileno são mantidas numa sala climatizada (18-20 °C), (Figs. 15 e 16) sob iluminação e arejamento contínuos. É fornecido, conjuntamente com o arejamento, CO<sub>2</sub> na razão de 1-2% do volume de ar, com vista a controlar o pH do meio e permitir atingir concentrações celulares mais elevadas, e um crescimento mais rápido. O CO<sub>2</sub> utilizado é normalmente fornecido em botijas com um manómetro de pressão e um debitómetro, sendo a mistura com o ar feita previamente à entrada na canalização geral da sala de culturas, num recipiente que poderá ser um frasco de vidro transparente com água onde faz borbulhar o CO<sub>2</sub> por forma a ser visível a sua mistura.

Como o CO<sub>2</sub> é mais pesado que o ar deve garantir-se uma correcta mistura por



Figura 14 – Tubo de acrílico para produção de microalgas.



Figura 15 – Produção de microalgas em mangas de polietileno de 80L.

forma a que as quantidades não saiam alteradas recebendo umas culturas maiores quantidades que outras.

Em certas regiões, quando as condições climáticas o permitem, é possível fazer culturas complementares no exterior (ou em estufas) num variado tipo de estruturas como mangas de polietileno transparente (Figs.16), tubos acrílico (Zittelli *et al.*, 2006), tubos de fibra de vidro translúcida, fotobioreactores tubulares e em painel

(Cheng-Wu *et al.*, 2001) e tanques de médios e grandes volumes (>10m<sup>3</sup>), (Fig. 17) e tanques de terra (Borowitzka, 2005), permitindo aumentar a produção com custos mais reduzidos.

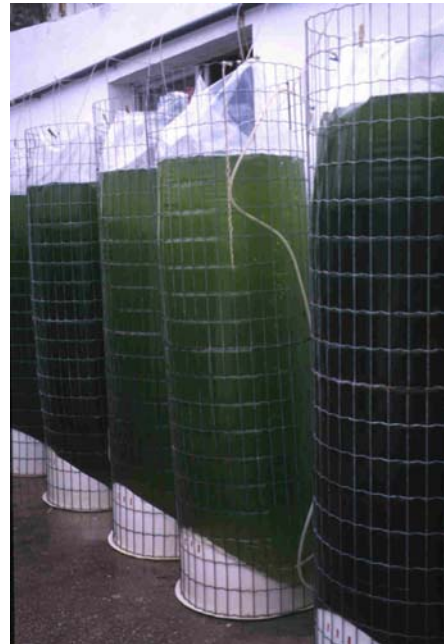


Figura 16 - Produção de microalgas em mangas de polietileno de 400L.

A utilização de vários passos (volumes) intermédios, isolados uns dos outros, permite uma separação das culturas e reduz as possibilidades de contaminações.

Toda a produção tem de ser encadeada de modo a não haver interrupções. Quando se utiliza um balão outro deverá ser inoculado e assim sucessivamente.



Figura 17 – Tanques de produção de microalgas em grande escala.

### Estruturas de produção

Como foi referido uma das condições essenciais para o sucesso desta cultura é a assepsia, de modo a evitar contaminações.

Assim, normalmente existe uma sala refrigerada ou câmara frigorífica destinada a



inóculos, com acesso através da sala de produção e um laboratório para os trabalhos inerentes à preparação das culturas.

Nestas salas só pode entrar equipamento e acessórios devidamente esterilizados.

A sala de produção de grandes volumes (mangas), deve também ser só destinada à produção de microalgas. Todo o equipamento e acessórios deste sector tem de estar devidamente esterilizado e só servir para este fim, não circulando por toda a instalação, assim como tem ser proibida a entrada de equipamento de outros sectores.

À entrada da sala é comum existir um "lava pés" com lixívia, de passagem obrigatória para quem circule nesta zona.

Estas salas são refrigeradas de forma a manterem a temperatura dentro dos valores pretendidos (18-20°C). Nos cálculos da refrigeração deverá ter-se em conta o calor produzido pelo grande número de lâmpadas permanentemente ligadas. Como se utilizam lâmpadas fluorescentes devem instalar-se os seus balastos separadamente, ex., num quadro com boa ventilação no exterior, de forma a reduzir os custos energéticos correspondentes ao seu arrefecimento dentro da sala.

A água salgada destinada a este sector deverá, além da filtração normal de toda a água da maternidade, ser filtrada por filtros tipo cartucho ("cartridge"), instalados em série, de 50µm, 20µm, 5µm, 1µm e 0,5µm. É também bastante aconselhável a sua esterilização por ultravioletas, após esta filtração. Para manter o débito de água é necessário instalar uma electrobomba antes dos filtros. O ar para os cultivos deverá também ser filtrado a 0,5µm de modo a evitar contaminações.

Como foi referido as salas de produção de microalgas são unidades individualizadas e separadas por portas do resto da unidade. A entrada de pessoas nesta área deve ser restritiva e passando por um "lava-pés" com lixívia. Os utensílios de trabalho (baldes, copos, mangueiras, etc.) devem ser apenas para este trabalho e estar devidamente identificados. Deverá existir um orifício na parede que permita a passagem de mangueiras para o exterior para encher bidões destinados a outras áreas e para fornecer directamente alga aos tanques de rotíferos.

### Fotorreactores ou fotobiorreactores

Actualmente, utilizam-se novas tecnologias para a produção de grandes quantidades de microalgas em fotorreactores ou fotobiorreactores em cultivo semi-contínuo (García-Malea López *et al.*, 2006; Marxen *et al.*, 2005; Pulz & Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006). Os fotobiorreactores podem ser definidos, segundo Tredici, 2004), como sistemas de cultivo onde uma grande parte da luz (> 90%) não atinge directamente o cultivo celular mas tem de passar através das paredes transparentes do reactor para atingir as células em cultivo. Deste modo, as mangas de polietileno ou os tubos de acrílico que utilizamos entram dentro desta categoria, embora o termo apareça mais associado a sistemas tubulares ou de tipo painel, com diversas formas e dimensões (Figs. 18 e 19). Nos sistemas tubulares o meio de cultivo está sempre em circulação através de bombagem e nos sistemas de painel poderá estar de igual modo em circulação ou as culturas serem mantidas em suspensão através de arejamento.

Estes sistemas (tubulares ou de painel) apresentam vantagens nomeadamente no que se refere à iluminância, permitindo uma penetração mais uniforme da luz (Richmond, 2004).

Estas microalgas têm diversas aplicações nomeadamente como alimento ou para “água verde” em aquacultura, para incorporação em rações para gado e em alimentos para consumo humano, para a industria farmacêutica e industria cosmética. A produtividade destes cultivos assim como o perfil bioquímico das microalgas depende da espécie utilizada, das condições abióticas, dos nutrientes e da metodologia empregue (Doucha *et al.*, 2005; Zhang & Richmond, 2003). As microalgas provenientes destes sistemas são normalmente apresentadas na forma de concentrado (“pasta de alga”) ou liofilizadas.



Figura 18 – Fotobiorreactores - Tubos de acrílico e de fibra de vidro translúcida e painéis para a produção de microalgas.



Figura 19 – Fotobiorreactor tubular (Necton – Olhão, Portugal).



## **Contaminações**

Uns dos principais problemas que afectam as culturas de microalgas são as contaminações, que poderão ser por bactérias, outras microalgas, ciliados, rotíferos ou outro zooplâncton. No caso das contaminações por bactérias, que afectam seriamente o crescimento dos cultivos, poderão não afectar do mesmo modo as diferentes espécies de microalgas (Salvesen *et al*, 2000)

As fontes de contaminação poderão ser várias, destacando-se:

1. Inóculo contaminado;
2. Utensílios (vidraria, tubos de arejamento e utensílios de trabalho) mal lavados e mal desinfectados;
3. Água utilizada;
4. Ar utilizado - é vulgar a existência de água nas canalizações de ar provenientes de condensações, onde se desenvolvem bactérias e ciliados (Hoff & Snell, 1997).
5. Manuseamento inadequado, sem as devidas precauções e desinfecções e com as mãos sujas;
6. Nutrientes contaminados;
7. Tubos ensaio, “erlenmeyers” e de balões destapados, permitindo a entrada de insectos e salpicos de culturas adjacentes;

### Como evitar contaminações

#### **Ar**

► Filtração mecânica do ar, através de filtros de porosidade até 0,5µm e purga da água de condensação.

#### **Água**

► Filtração mecânica da água de entrada, através de filtros de porosidade até 0,5 µm, e tratamento posterior com radiação ultravioleta ou por ozono;

- ▶ Pasteurização da água por aquecimento a 50 °C durante 10 h a 24 h (pequenos e médios volumes), (Hoff & Snell, 1997) ou 65 °C durante pelo menos 30 minutos repetindo o processo após 24 h;
- ▶ Esterilização da água em autoclave durante 20 minutos a uma pressão de 20 psi e 120 °C (pequenos volumes). No caso de água já conter os nutrientes e estes precipitarem deverá ter-se o cuidado de os resuspender (após o seu arrefecimento);
- ▶ Esterilização da água em micro-ondas (pequenos volumes), durante 8 a 10 minutos por cada 1 L a 1,5 L de água num equipamento de 700 watt de potência (Hoff & Snell, 1997). Esta água poderá conter os nutrientes. A esterilização por micro-ondas não afecta os esporos de fungos pelo que outro método deverá ser utilizado;
- ▶ Desinfecção por cloro da água (médios e grandes volumes) com lixívia (hipoclorito de sódio) na razão de  $1\text{mL.L}^{-1}$  para um produto com 10% de cloro activo. O tempo de esterilização deverá ser superior a 4 horas, sendo o ideal entre 12h e 24h. A neutralização poderá ser feita com tiosulfato de sódio ( $1\text{ mL.L}^{-1}$  de uma solução de  $150\text{g.L}^{-1}$  de água destilada) e a confirmação com o-tolidina ou com um “kit” de piscina para teste de cloro;
- ▶ Utilização de água salgada artificial quando se justifique.

## Equipamentos

- ▶ Lavagem com um detergente apropriado em água quente e passagem por água com 5% de ácido clorídrico;
- ▶ Imersão numa solução desinfectante, durante algumas horas (ex: água com  $10\text{mL.L}^{-1}$  de hipoclorito de sódio (lixívia));
- ▶ Outros químicos como o álcool a 50-70% e formol a 2-5%;
- ▶ Esterilização de equipamentos e vidraria em autoclave durante 20 minutos a uma pressão de 1,4 atm (20psi) e 121°C.

Quando o equipamento possibilita, esterilização de equipamentos e vidraria em autoclave 2 atm (29,4psi), 121 °C, 10 a 20 minutos para pequenos volumes e 1 h para volumes maiores (ex: balão 10 L), (Kawachi & Noel, 2005).

(1 atm = 1,013 bar = 14, 7 psi);

- ▶ Esterilização de equipamentos e vidraria em estufa a 250 °C, durante 3 a 5 h ou 150 °C durante 3 a 4 h (Kawachi & Noel, 2005);
- ▶ Esterilização de vidraria e equipamentos apropriados em micro-ondas durante 3 minutos ou 45 minutos em equipamento já seco (juntar um pouco de água num recipiente à parte), (Hoff & Snell, 1997). Após arrefecer todo o equipamento deverá ser convenientemente guardado e a boca da vidraria tapada com papel de alumínio ou Parafilm<sup>®</sup>;
- ▶ Utilização do bico de bunzen (vidraria, boca de tubos de ensaios e balões).
  - Verificar se a vidraria e outros equipamentos estão preparados para os métodos de esterilização indicados.

**Inoculos e meios com nutrientes**

- ▶ Observar previamente o seu estado ao microscópio a fim de se detectarem eventuais bactérias, outras espécies de microalgas ou ciliados.

## Cultivo heterotróficos

A constante procura de fontes alternativas de ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente de EPA e DHA, tem também incidido na forma como se poderão produzir algumas microalgas. Existem deste modo, cultivo heterotróficos de microalgas em que se utilizam outras fontes de carbono e de energia (carbono orgânico como açúcares ou ácidos orgânicos). Estes cultivos não requerem luz e possibilitam um aumento da densidade celular e da produtividade (Behrens, 2005; Chen, 1996; Wen & Chen, 2003). Podem ser dirigidos, por exemplo, a uma maior produção de EPA em relação aos cultivos tradicionais (Behrens, 2005; Wen & Chen, 2002; Wen & Chen, 2003).

Os cultivos heterotróficos de microalgas e fungos estão no seu início apresentando um grande potencial na substituição de óleos de peixes nos alimentos para aquacultura. As produções actuais desta tecnologia ainda não são significativas mas poderão a vir a ter um papel importante num futuro próximo como fontes alternativas de ARA, EPA e DHA (Harel *et al.*, 2002, Harel & Place, 2004). Existem no mercado produtos secos resultantes de cultivo heterotróficos que são utilizados para enriquecimento de rotíferos ou *Artemia* spp. (ex: Algamac<sup>®</sup>, Aquafauna, Bio-Marine, Inc.)

No entanto, como não se incluem nas produções habituais de microalgas para aquacultura, as metodologias destes cultivos não serão aqui desenvolvidas.

## APLICAÇÃO EM CULTIVOS MARINHOS

A utilização de microalgas nos cultivos marinhos, nomeadamente como primeiro elo da cadeia alimentar de peixes marinhos é de primordial importância. São utilizadas para dois fins:

- Manutenção e crescimento de zooplâncton, principalmente rotíferos (*Brachionus plicatilis*) com vista a transferir nutrientes essenciais para o alimento vivo. Poderão ser utilizadas para enriquecer ou bioencapsular o zooplâncton mas como na sua generalidade não possuem concentrações de ácidos gordos polinsaturados, principalmente EPA e DHA, em quantidade suficiente para os peixes marinhos (dourada e robalo) utilizam-se produtos comerciais para este fim;

- Introdução nos tanques larvares de variadas espécies marinhas, como a dourada e outros esparídeos e o rodovalho (*Scophthalmus maximus*), o denominado método da “água verde”, com vista a manter a qualidade nutritiva dos rotíferos e *Artemia* spp. e a qualidade da água nos tanques larvares. Nestas circunstâncias actua como suplemento alimentar para as larvas e como alimento para as presas (Faulk & Holt, 2005; Hoehne-Reitan *et al.*, 2001; Muller-Feuga 2000; Papandroulakis *et al.*, 2001; Shields, 2001). A presença de algas nos tanques larvares contribui para modificar e estabilizar a qualidade nutricional dos rotíferos. O conteúdo lipídico dos rotíferos e a sua composição em ácidos gordos reflectem a composição das microalgas que consumiram (Nery *et al.*, 1995).

As espécies de microalgas utilizadas podem ser importantes para manter o conteúdo das presas em ácidos gordos (especialmente em EPA e DHA), (Reitan *et al.*, 1997; Pousão-Ferreira *et al.*, 1998).

A introdução nos tanques de microalgas juntamente com os rotíferos, segundo Reitan *et al.*, (1997) e Oie *et al.*, (1997), nos primeiros dias de alimentação das larvas de pregado (*Scophthalmus maximus*) e de alabote (*Hippoglossus hippoglossus*), aumentam o crescimento e a sobrevivência das larvas. No entanto, a bioencapsulação dos rotíferos com microalgas, por curto período de tempo, não melhoram o crescimento e a sobrevivência das larvas em tanques em que não se adicionaram microalgas. Segundo os mesmos autores, os estados larvares iniciais dos peixes marinhos ingerem microalgas, mas estas são assimiladas de forma

diferente, por exemplo, no rodovalho e no alabote. As microalgas ingeridas poderão contribuir para os processos digestivos e para o estabelecimento da flora intestinal e poderão modificar as populações bacterianas da água e dos rotíferos. Poderão também contribuir para o controlo das populações de bactérias no meio (Stottrup *et al.*, 1995).

Por outro lado contribui para a alteração da luminosidade do meio facilitando a captura das presas.

A utilização de microalgas liofilizadas das espécies *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* para a produção da “água verde” e para o enriquecimento de rotíferos parece também apresentar bons resultados, com a vantagem da facilidade da sua utilização (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001, Navarro *et al.*, 2001).

Resumindo, o efeito da água verde, ainda que não esteja claramente identificado, melhora a sobrevivência larvar. A sua utilização poderá contribuir para:

- A estabilização da qualidade da água, pela remoção da amónia e outros produtos azotados e pela produção de O<sub>2</sub>;
- A alimentação das larvas ao ingerirem as microalgas;
- A manutenção do valor nutricional das presas;
- Aumentarem a visibilidade das presas pelas larvas melhorando o contraste e a dispersão da luz;

Além da escolha da espécie de microalga a utilizar são fundamentais as condições em que é produzida e utilizada. Deste modo pretende-se:

- Um crescimento rápido de modo a rentabilizar estruturas e mão-de-obra;
- Máxima concentração celular para a espécie de modo a rentabilizar a sua utilização, que é feita em células por mililitro;
- Melhor perfil nutritivo adequado às espécies a que se destinam.

Este último aspecto é de primordial importância e está directamente relacionado com as condições de cultivo e a idade da cultura. A composição lipídica é também

influenciada pela quantidade e tipo de nutrientes disponíveis (Otero *et al.*, 1997a, Otero *et al.*, 1997b). Por outro lado, o conteúdo em ácidos gordos polinsaturados da série *n-3* varia entre diferentes espécies e com as limitações de crescimento celular (Reitan *et al.*, 1997, Tonon *et al.*, 2002).

Neste trabalho, e de acordo com as necessidades das espécies marinhas cultivadas, que necessitam de ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA *n-3*) relacionamos a idade da cultura com a sua concentração celular e perfil em ácidos gordos.

### O género *Nannochloropsis*

O género *Nannochloropsis* aparenta incluir diversas espécies similares que têm sido objecto de muito debates devido a desacordo quanto à sua classificação. Estas espécies, como foi referido, são consideradas algas unicelulares da família Eustigmatophyceae, com uma forma esférica e um diâmetro entre 1 e 4 µm. *Nannochloropsis* spp. é uma das espécies mais utilizadas em aquacultura, principalmente como alimento para *Artemia* spp. e *Brachionus plicatilis* assim como para a larvicultura de muitas espécies de peixes e crustáceos.

Esta alga apresenta quantidades relativamente elevadas de lípidos (Hoshida *et al.*, 2005) incluindo uma concentração importante de 20:5n-3 (superior a 20% dos ácidos gordos totais), e uma quantidade razoável de 20:4n-6 (5-20% dos ácidos gordos totais). No que se refere a 22:6n-3 ( $\leq 0,2\%$ ) apresenta quantidades muito reduzidas e em relação a 18:2n-6 e de 18:3n-3 apresenta valores intermédios e uma proporção de ácidos gordos saturados da ordem dos 27% (Brown *et al.*, 1997; Fernández-Reiriz & Labarta, 1996, Roncarati *et al.*, 2004).

Alguns autores referem que esta alga é um alimento adequado para rotíferos, transferindo algumas substâncias essenciais para as larvas de peixes (Sukenik *et al.*, 1993), apresentado níveis de HUFA (*n-3*) suficientemente elevados para satisfazer as necessidades nutricionais das fases larvares dos peixes (Caric *et al.*, 1993). Neste sentido, por vezes no cultivo de larvas dourada utiliza-se inicialmente, até ao 8<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> dia, esta microalga para bioencapsular os rotíferos usando-se posteriormente produtos comerciais ricos em EPA e DHA mas que libertam mais

gordura para os tanques e que dificultam a insuflação da bexiga gasosa por parte das larvas.

#### Perfil em ácidos gordos de *Nannochloropsis* spp.

No caso de *Nannochloropsis* spp. o perfil em ácidos gordos parece estar dependente, entre outros factores da sua concentração e da idade da cultura (Narciso *et al*, 1998).

Deste modo, a concentração celular parece ser um parâmetro a ter em conta, podendo ser possível manipular o perfil em ácidos gordos através da utilização de diferentes concentrações celulares, na mesma fase de crescimento.



## PERFIL EM ÁCIDOS GORDOS DE MICROALGAS UTILIZADAS NO CULTIVO DE DOURADA E OUTROS ESPARIDEOS.

O crescimento e a concentração final (fase estacionária) de uma microalga é um factor de primordial importância para a sua escolha e para a rentabilização das estruturas de produção. A dimensão de uma sala para cultivo de microalgas é feita tendo como base a rotatividade das culturas ou seja quantos litros de microalga pronta a utilizar se consegue produzir numa determinada área num determinado período de tempo. Esta produção devido aos custos energéticos, de mão-de-obra e de consumíveis tem um peso significativo no custo de produção dos juvenis pelo que importa rentabilizá-la ao máximo.

Para se obter a “água verde”, anteriormente descrita, é necessária, no caso de utilização de *Nannochloropsis spp.* cerca de  $150.000 \text{ cel.mL}^{-1}$  e no caso de *Isochrysis spp.* cerca de  $50.000 \text{ cel.mL}^{-1}$  nos tanques de cultivo larvar. Por outro lado, é prática corrente induzir “blooms” de rotíferos em mangas de microalgas para, logo que os rotíferos atinjam uma concentração elevada (acima de  $250 \text{ rot.mL}^{-1}$ ), iniciar tanques de cultivo deste zooplâncton. É deste modo de extrema importância a escolha da espécie que se pretende utilizar visto o volume a produzir variar com a concentração celular obtida e o tempo de crescimento.

Com o objectivo de verificar a concentração celular final e o tempo de crescimento de algumas das espécies de microalgas utilizadas na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, foram efectuados diversos ensaios de cultivo em mangas de polietileno com um volume de 80L.

O material biológico utilizado foi microalgas das espécies *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis aff. galbana* (“T.Iso”) e *Isochrysis galbana*. O crescimento foi realizado em mangas de polietileno transparente com 80 L de volume, inoculadas em diferentes proporções a partir de balões concentrados, numa sala com 24 h de fotofase, 20°C de temperatura e 38 de salinidade. Todos os ensaios foram realizados com triplicados. Foi utilizado arejamento forte para manter as células em suspensão mas não foi adicionado CO<sub>2</sub>. As concentrações iniciais e finais e o tempo de duração dos cultivos estão resumidos na Tabela III.

Tabela III – Concentrações celulares iniciais e finais das várias espécies de microalgas estudadas, tempo de duração dos cultivos e crescimento diário obtido.

Espécie	[ ] inicial (cel.mL <sup>-1</sup> )	[ ] final (cel.mL <sup>-1</sup> )	Dias de cultivo	Crescimento dia %
<i>Nannochloropsis oculata</i>	2.100.000	18.800.000	17	52,7%
<i>Nannochloropsis oculata</i>	2.350.000	18.100.000	18	42,8%
<i>Nannochloropsis oculata</i>	5.200.000	25.400.000	19	25,7%
<i>Nannochloropsis oculata</i>	2.900.000	29.500.000	20	50,9%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	3.660.000	19.480.000	21	25,3%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	4.430.000	17.930.000	21	19,3%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1.480.000	19.000.000	20	64,2%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1.300.000	19.400.000	20	74,6%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	4.000.000	26.900.000	20	33,6%
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	3.800.000	24.000.000	20	31,6%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	820.000	7.730.000	17	55,5%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	790.000	7.630.000	17	56,8%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	570.000	9.405.000	19	86,8%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	320.000	10.400.000	15	216,7%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	610.000	10.220.000	19	88,2%
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-Iso)	530.000	8.590.000	19	85,3%
<i>Isochrysis galbana</i>	520.000	10.220.000	19	103,4%
<i>Isochrysis galbana</i>	470.000	10.290.000	19	115,2%
<i>Isochrysis galbana</i>	495.000	10.255.000	19	109,0%
<i>Isochrysis galbana</i>	330.000	7.845.000	15	158,5%

O tempo de crescimento aqui apresentado, é de um modo geral, demasiado longo para as necessidades de rentabilização da produção numa maternidade. Nestes ensaios, esse tempo foi propositadamente prolongado até ao fim da fase estacionária e declínio dos cultivos, no caso das microalgas do género *Isochrysis*, visto o género *Nannochloropsis* ter continuado a crescer, de modo a verificar qual o tempo utilizável de cada microalga.

Verifica-se deste modo que a concentração final está dependente da concentração inicial, do tempo de cultivo e da espécie. A microalga *Isochrysis galbana* e a microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso), embora atinjam menores concentrações finais, têm melhores taxas de crescimento. Atingem também mais rapidamente a fase de declínio. Verifica-se também uma grande variabilidade entre diferentes ensaios embora aparentemente as condições de cultivo sejam semelhantes. Nas Figuras 20 e 21 apresentam-se algumas curvas de crescimento destas microalgas.

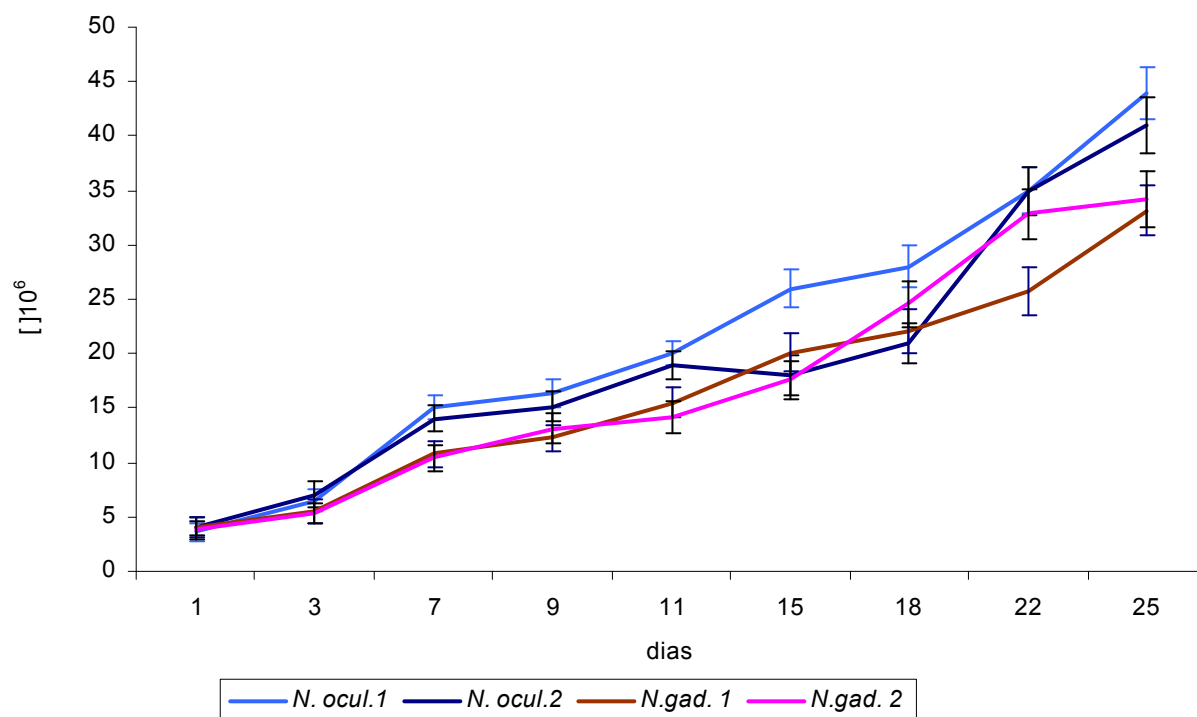


Figura 20 – Crescimento (concentração celular  $\times 10^6$ ) em manga de polietileno de *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana*.

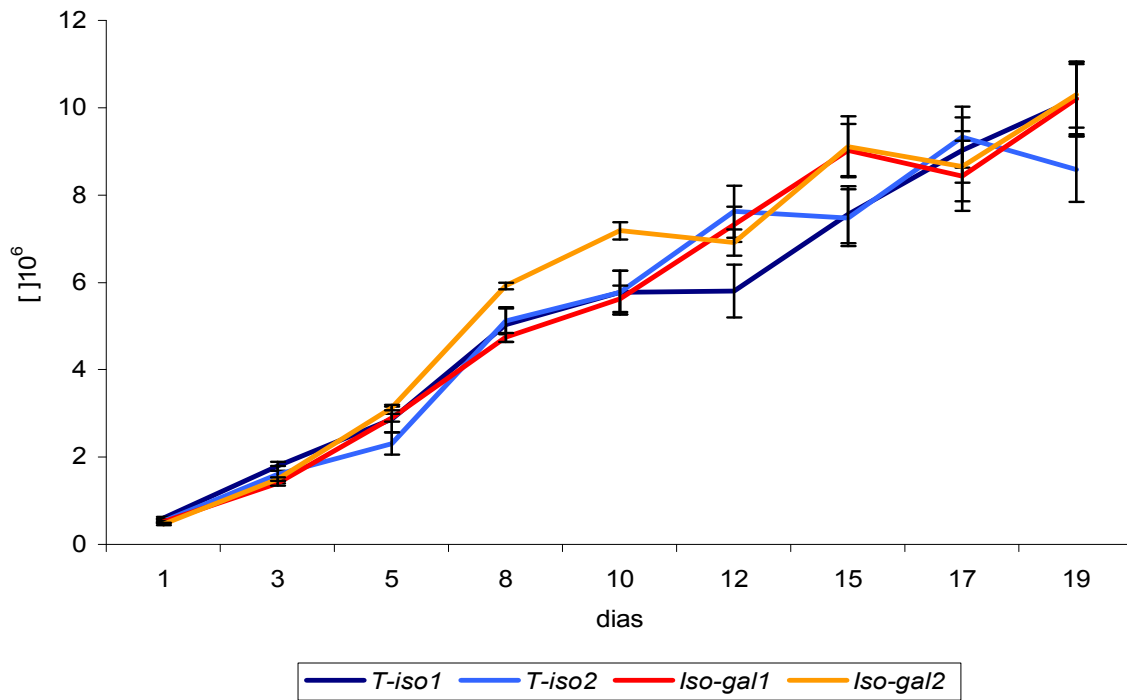


Figura 21 – Crescimento (concentração celular  $\times 10^6$ ) em manga de polietileno de *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso) e *Isochrysis galbana*.

- Comparação do perfil lipídico de várias espécies de microalgas - *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)*, *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana*.

Um dos aspectos a considerar no cultivo de uma espécie de microalga é o seu perfil nutritivo, especialmente em ácidos gordos, considerando as espécies alvos a que se destinam como foi referido anteriormente. Deste modo, realizaram-se cultivos das microalgas *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)*, *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana* com o objectivo de avaliar o perfil em ácidos gordos quer em função de cada espécie quer da respectiva concentração celular.

Nas Figuras 22, 23 e 24 apresenta-se o perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, o perfil por grupos de ácidos gordos e a relação  $n-3/n-6$  e DHA/EPA de *Isochrysis galbana*, *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)* ao fim de 11 e 14 dias de cultivo. Verifica-se que a microalga da espécie *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)* apresenta um melhor perfil nos ácidos gordos referidos, à excepção dos valores de DHA ao fim de 14 dias de cultivo. A relação DHA/EPA é maior na *Isochrysis galbana* embora só nos dados referentes ao dia 14 apresente valores superiores de DHA. Na microalga *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)* os valores em DHA para este dia de cultivo diminuem o que contribui para acentuar a diferença na relação DHA/EPA em relação a *Isochrysis galbana*.

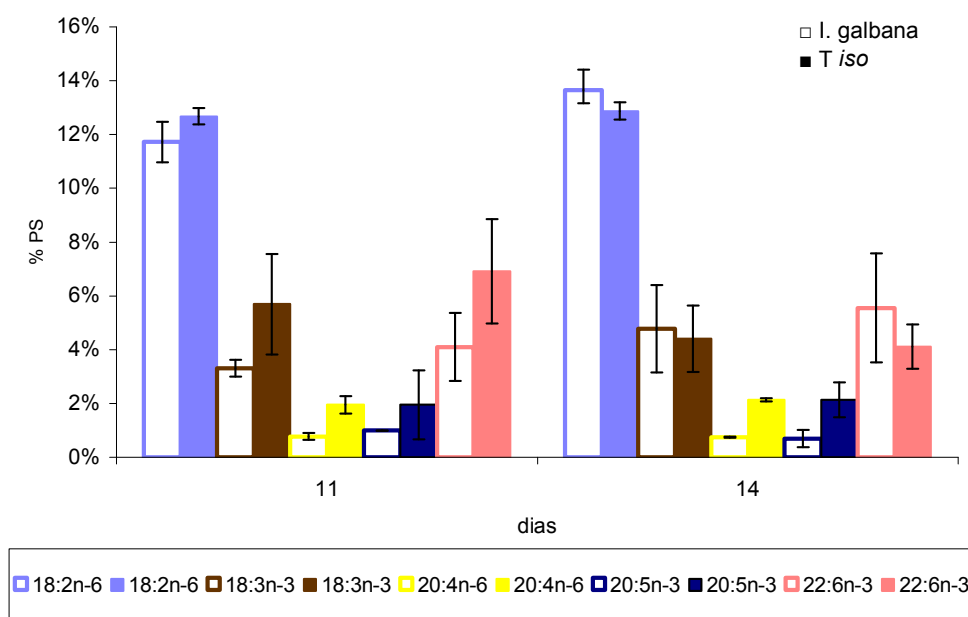


Figura 22 – Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Isochrysis galbana* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

De um modo geral, não nos parecem importantes as diferenças entre ambas pelo que se poderão utilizar as duas espécies ou a que melhor se adapte às condições de cultivo do local.

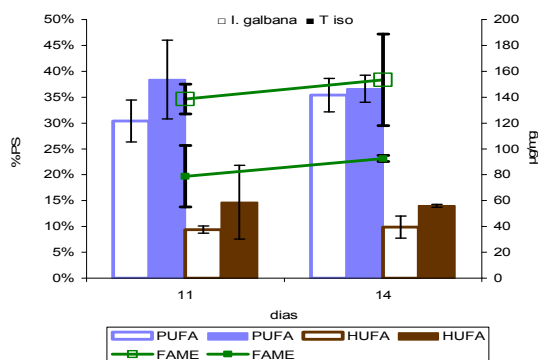


Figura 23 – Perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Isochrysis galbana* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

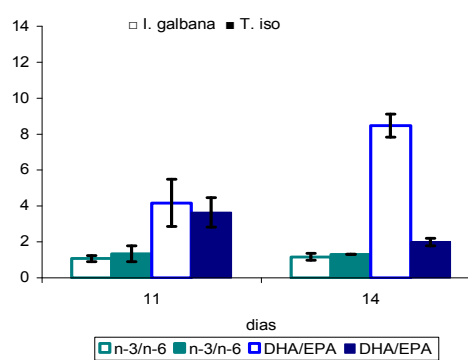


Figura 24 – Relação n3/n6 e DHA/EPA de *Isochrysis galbana* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

Nas Figuras 25, 26 e 27 apresenta-se o perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, o perfil por grupos de ácidos gordos e a relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana* ao longo de vários dias de cultivo. Verifica-se que o perfil destas espécies é

bastante semelhante com uma ligeira superioridade em PUFA e em HUFA para a *Nannochloropsis gaditana*. Em termos de crescimento são também bastante semelhantes com ligeira vantagem para *Nannochloropsis oculata*.

De um modo geral, também neste caso, não nos parecem muito relevantes as diferenças entre ambas pelo que se poderão utilizar as duas espécies ou a que melhor se adapte às condições de cultivo do local.

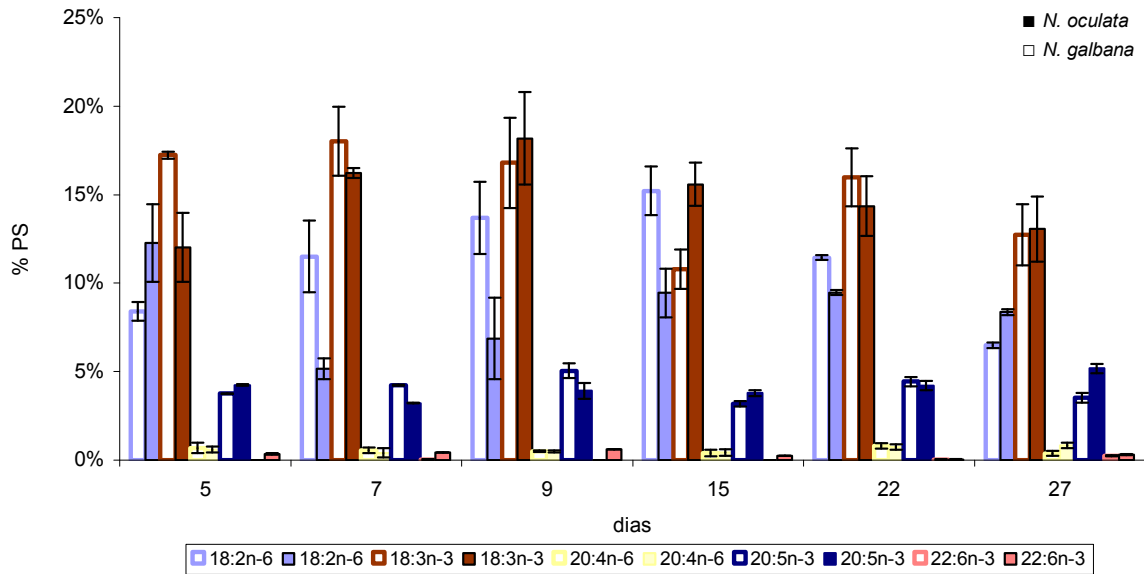


Figura 25 – Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana*.

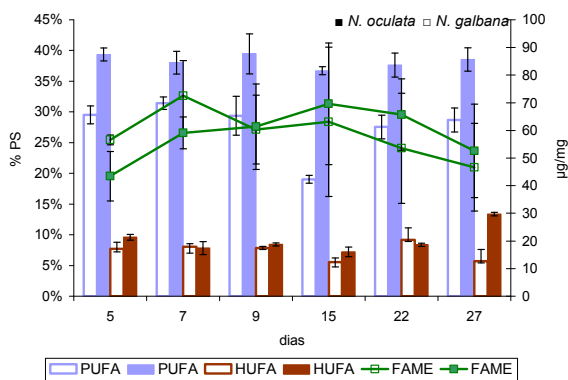


Figura 26 – Perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana*.

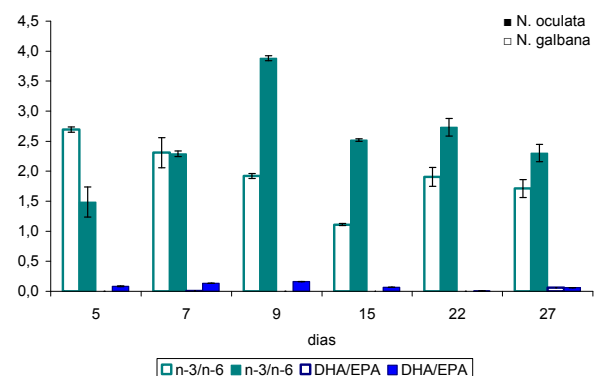


Figura 27 – Relação n3/n6 e DHA/EPA de *Nannochloropsis oculata* e *Nannochloropsis gaditana*.

- Comparação do crescimento e do perfil lipídico de *Nannochloropsis gaditana* e de *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

Tendo em conta os dados anteriores comparam-se quer do ponto de vista de crescimento quer do perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, o perfil nos principais grupos de ácidos gordos e a relação  $n-3/n-6$  e DHA/EPA de *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*. Pelas características que apresentam estas espécies complementam-se pelo que normalmente são produzidas em simultâneo nas maternidades de peixes marinhos. Na Figura 28 compara-se o crescimento das duas espécies, verificando-se que as microalgas do género *Nannochloropsis* spp. apresentam uma maior velocidade de crescimento e uma muito maior concentração celular.

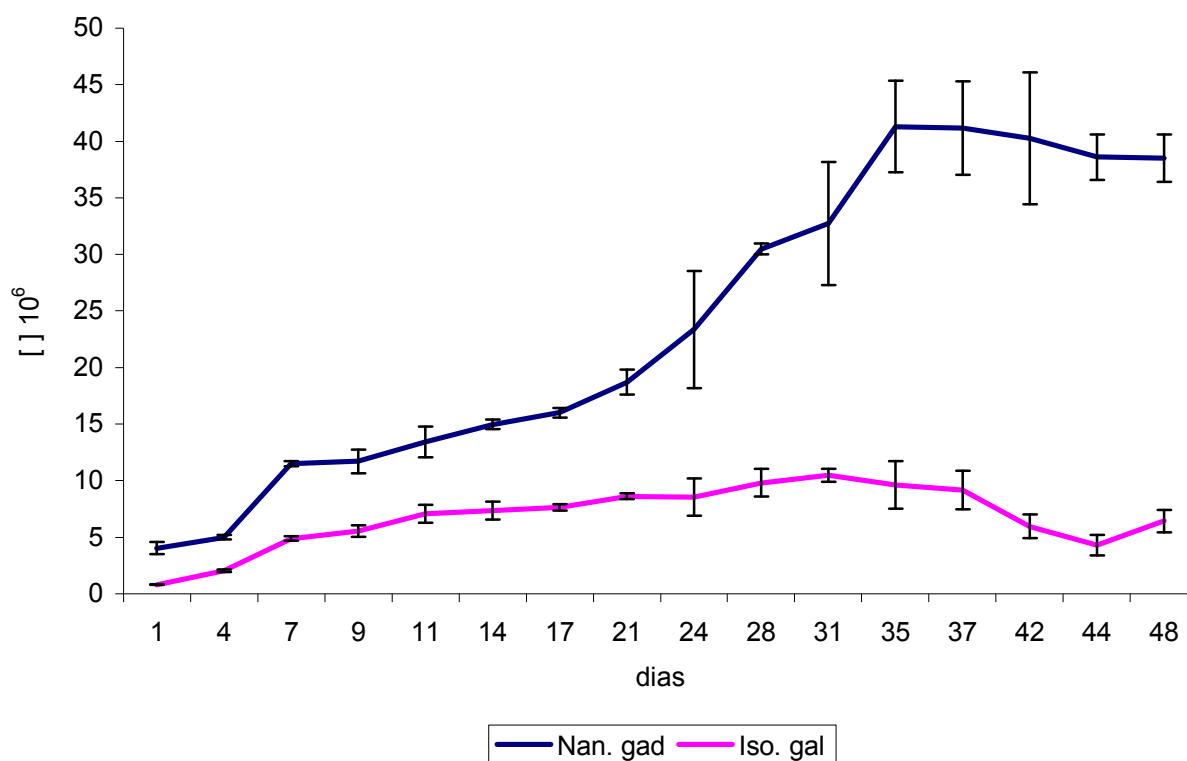


Figura 28 – Crescimento de *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*.

Nas Figuras 29, 30, 31 e 32 apresenta-se o perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, o perfil por grupos de ácidos gordos e a



relação  $n-3/n-6$  e DHA/EPA. Verifica-se que a microalga *Nannochloropsis gaditana* apresenta valores superiores em EPA e que a microalga *Isochrysis galbana* valores superiores em DHA e uma melhor relação DHA/EPA.

Esta diferença de perfil é interessante do ponto de vista das espécies que cultivamos permitindo que, com a mistura das duas microalgas, se consigam diferentes perfis em ácidos gordos, tendencialmente mais equilibrados tendo em conta as necessidades de enriquecimento de rotíferos e *Artemia* spp.

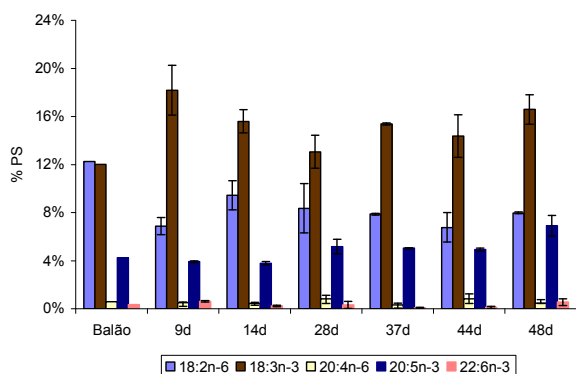


Figura 29 – Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Nannochloropsis gaditana* em função da idade do cultivo.

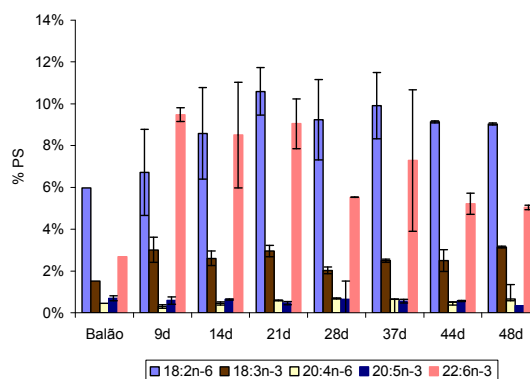


Figura 30 – Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Isochrysis galbana* em função da idade do cultivo.

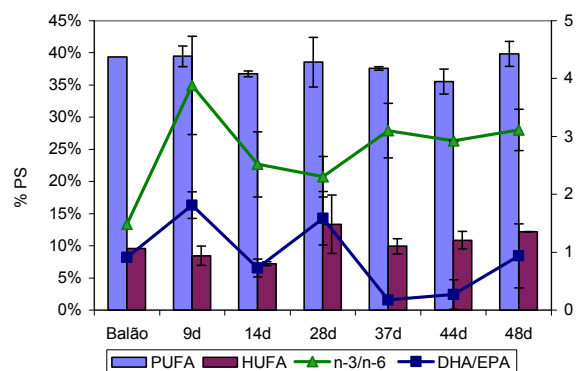


Figura 31 – Perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Nannochloropsis gaditana* em função da idade do cultivo. Razão  $n-3/n-6$  e DHA (escala da direita).

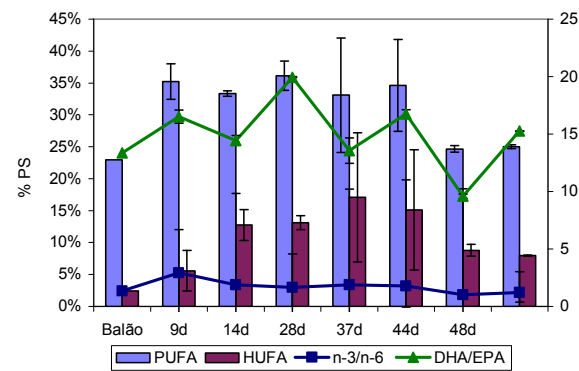


Figura 32 – Perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Isochrysis galbana* em função da idade do cultivo. Razão  $n-3/n-6$  e DHA (escala da direita).

Parece-nos deste modo importante o cultivo e a utilização em conjunto de microalgas dos géneros *Nannochloropsis* spp. e *Isochrysis* spp. quer no enriquecimento de presas para larvas de peixes marinhos quer para utilização no método de “água verde”.

- Ensaios de crescimento sem e com adição de CO<sub>2</sub> conjuntamente com o arejamento.

Com vista a avaliar a utilização de CO<sub>2</sub> misturado com o ar atmosférico no cultivo de microalgas fizeram-se ensaios de crescimento de *Nannochloropsis oculata*. Este foi realizado em mangas de polietileno transparente com 80 L de volume, inoculadas a partir de balões concentrados, numa sala com 24 h de iluminação, 20°C de temperatura, tendo-se utilizado 1% de CO<sub>2</sub> misturado com o arejamento. Na Figura 33 apresentam-se os resultados de crescimento e os valores de pH obtidos. Como foi anteriormente descrito a utilização de CO<sub>2</sub> contribui para manter o pH do meio e é uma importante fonte de carbono para a fotossíntese. Pela análise da figura verifica-se que é de grande importância a utilização de CO<sub>2</sub> para se obter uma maior concentração celular. Convém, no entanto, analisar bem a relação custo/benefício, principalmente quando não existe a necessidade de produzir grande quantidade de microalgas, tendo em conta o custo de utilização de CO<sub>2</sub>.

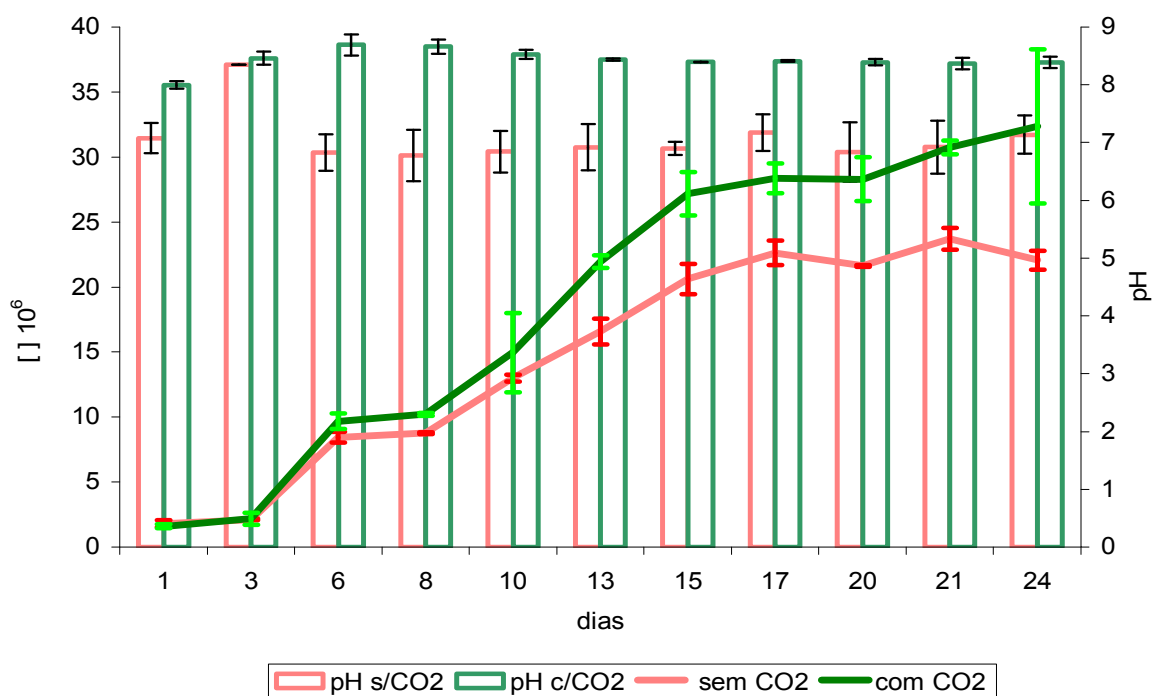


Figura 33 – Crescimento em manga de polietileno de *Nannochloropsis oculata* sem adição de CO<sub>2</sub> e com adição de 1% de CO<sub>2</sub>.

- Ensaio de crescimento e perfil lipídico, de *Nannochloropsis oculata* em duas salinidades, 25 e 35.

Este ensaio teve em conta o facto desta microalga ser utilizada para produzir blooms de rotíferos que depois são utilizados para inocular e iniciar os tanques de produção desta espécie. Os rotíferos são eurihalinos e o seu cultivo é feito normalmente a salinidade mais baixas - 20 a 30 – principalmente quando se utilizam leveduras ou produtos à base de leveduras. Por outro lado, também se podem produzir as larvas de dourada a salinidades mais baixas - 25 a 30 – o que segundo alguma bibliografia apresenta vantagens em termos de sobrevivência (Tandler *et al.*, 1995). Esta alga é utilizada para produzir o efeito de “água verde” pelo que apresentaria vantagens se estivesse à mesma salinidade que a água do tanque da larvas evitando choques salinos.

Foi testado o crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata* com duas salinidades diferentes - 25 e 35 – e analisado o seu perfil em ácidos gordos. O crescimento foi realizado em mangas de polietileno transparente com 80 L de volume, inoculadas a partir de balões concentrados, numa sala com fotofase de 24 h, 20°C de temperatura e 1% de CO<sub>2</sub> misturado com o ar atmosférico.

Verifica-se que em termos de crescimento (Fig. 34) as microalgas cultivadas à salinidade de 35 crescem mais rapidamente atingindo uma maior concentração celular ao fim de 22 dias. Se considerar-mos a sua utilização nos primeiros 11 dias verifica-se que a diferença de crescimento é mais atenuada. A partir deste período as microalgas cultivadas a 25 de salinidade diminuem abruptamente o seu crescimento que se torna bastante mais lento. Deste modo, poderá haver vantagem para evitar choque salino nos cultivos subsequentes desde que se controle diariamente o seu crescimento de modo a ser utilizada no início da fase estacionária.

Em relação ao perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, ao perfil por grupos de ácidos gordos e às relações *n-3/n-6* e DHA/EPA (Figs. 35, 36 e 37), verifica-se que são semelhantes acentuando-se as diferenças apenas para as concentrações mais elevadas da microalga cultivada a 35 de salinidade. Deste modo, em relação ao perfil nutritivo não parecem existir grandes diferenças, verificando-se que o mesmo vai variando, nos dois sentidos, ao longo do

período de crescimento.

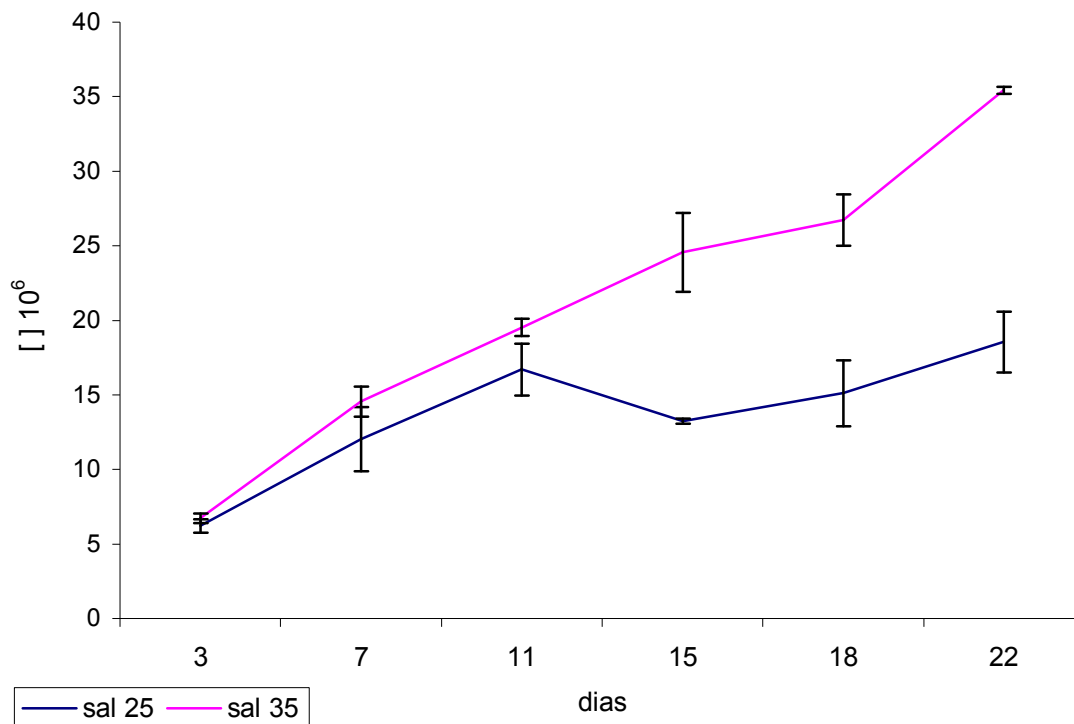


Figura 34 – Crescimento de *Nannochloropsis oculata*, cultivada em manga de polietileno, com diferentes salinidades (25 e 35).

Estes resultados são importante para os casos em que se utiliza água de furo artesiano, que muitas vezes têm a salinidade mais baixa que a água do mar, permitindo deste modo equacionar a sua utilização também na produção desta microalga. A água de furos artesanios é correntemente utilizada nas maternidades mas para além do seu teor em oxigénio ser muito baixo ou nulo, especial cuidado deverá ter-se em relação à sua composição química.

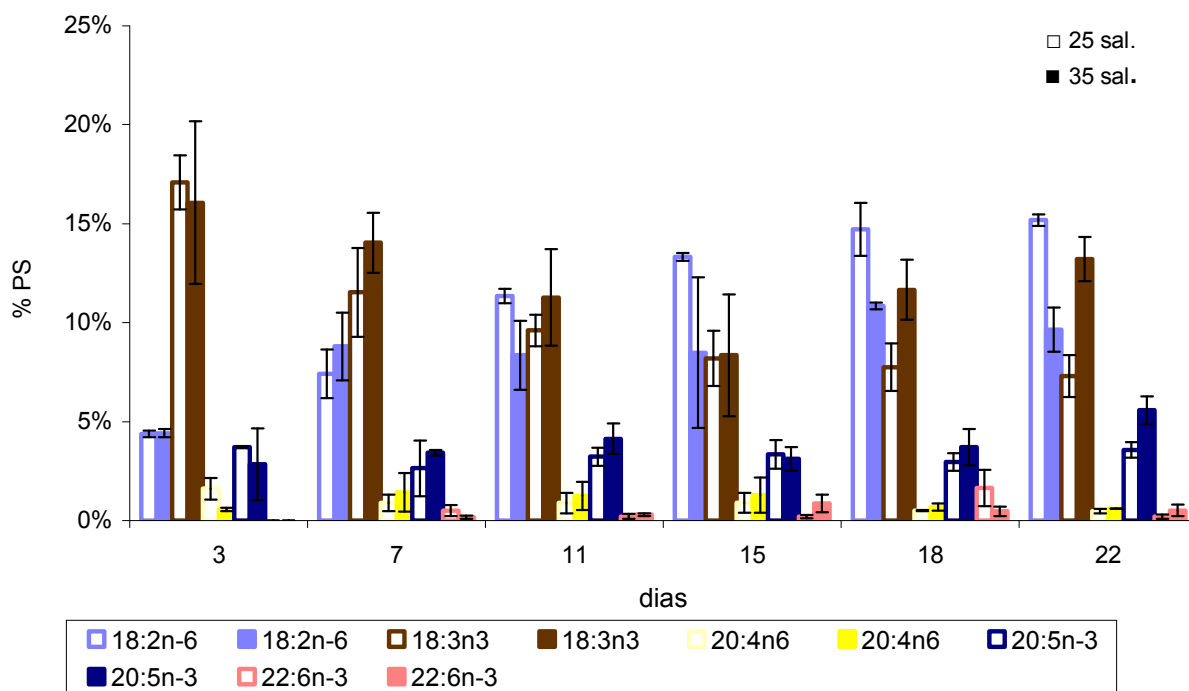


Figura 35 – Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas salinidades (25 e 35).

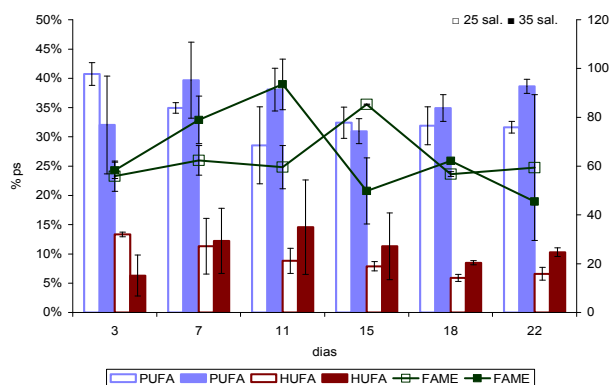


Figura 36 – Evolução do perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas salinidades (25 e 35). Razão  $n-3/n-6$  e DHA (escala da direita).

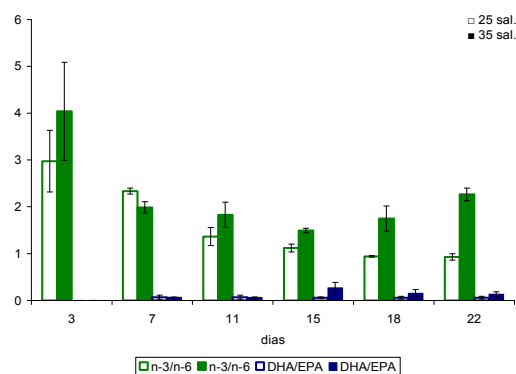


Figura 37 – Relação  $n3/n6$  e DHA/EPA de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas salinidades (25 e 35).

- Ensaios de crescimento a diferentes temperaturas, 20 °C e 25 °C

Este ensaio foi realizado com o objectivo de avaliar se um aumento da temperatura poderia trazer benefícios quer em termos de concentração celular quer de perfil nutritivo em ácidos gordos da microalga *Nannochloropsis oculata*. Deste modo, com o objectivo de verificar a influência da temperatura no crescimento e no perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, no perfil por grupos de ácidos gordos e na relação  $n-3/n-6$  e DHA/EPA, cultivou-se à temperatura de 20°C, normalmente utilizada nas maternidades, e a 25°C. O cultivo foi realizado em mangas de polietileno transparente com 80 L de volume, numa sala com uma fotofase de 24 h de luz, 35 de salinidade e 1% de CO<sub>2</sub> adicionado ao arejamento.

Verifica-se que em termos de crescimento (Fig. 38 e 39) as microalgas cultivadas à temperatura de 20°C crescem mais rapidamente atingindo uma maior concentração celular ao fim de respectivamente 23 e 21 dias. Estes ensaios foram efectuados em dois períodos distintos por se verificar uma certa tendência para a contaminação por ciliados dos cultivos efectuados a 25°C. No segundo grupo de ensaios, não existiu essa contaminação e foi deste que se tiraram amostras para as análises de ácidos gordos. Não quisemos, no entanto deixar de apresentar o primeiro grupo por nos parecer importante mostrar que a probabilidade de contaminação é maior a temperaturas mais elevadas.

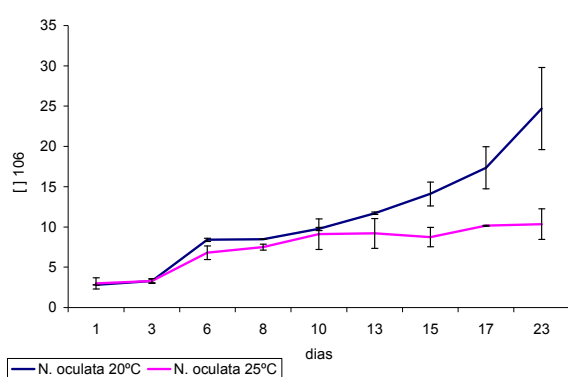


Figura 38 – Crescimento de *Nannochloropsis oculata*, em manga de polietileno, com diferentes temperaturas (20°C e 25°C). Primeiro ensaio.

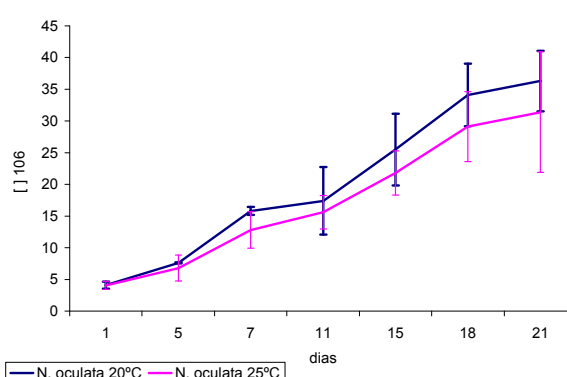


Figura 39 – Crescimento de *Nannochloropsis oculata*, em manga de polietileno, com diferentes temperaturas (20°C e 25°C). Segundo ensaio.

Considerando assim o segundo ensaio (Fig, 40), verifica-se que o crescimento não é beneficiado pelo aumento da temperatura, pelo que não existe vantagem na sua realização dentro das salas de produção de microalgas.

Em relação ao perfil dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, ao perfil por grupos de ácidos gordos e às relações *n-3/n-6* e DHA/EPA (Figs. 40, 41 e 42), verifica-se que são semelhantes não parecendo existir grandes diferenças, verificando-se que o mesmo vai variando, nos dois sentidos, ao longo do período de crescimento.

No entanto, estes resultados, quer em relação ao crescimento quer ao perfil em ácidos gordos, não deixam de ser interessantes se pensarmos em cultivos em estufas ou ao ar livre quando a temperatura ambiente o permite.

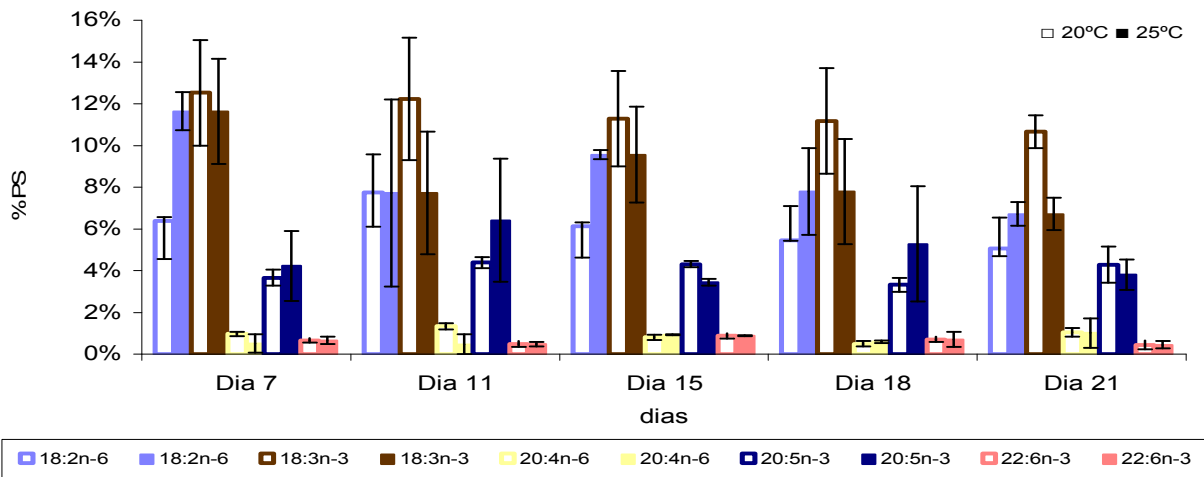


Figura 40 – Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas temperaturas (20°C e 25°C).

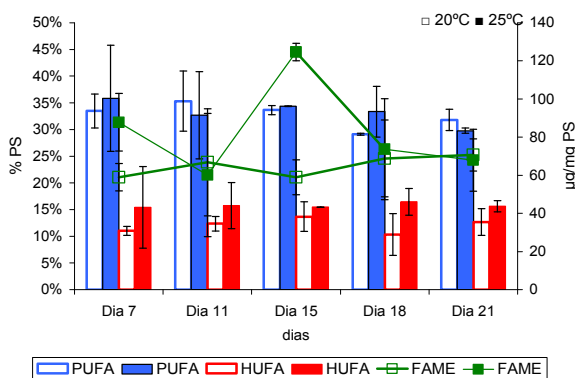


Figura 41 – Evolução do perfil nos principais grupos de ácidos gordos de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas temperaturas (20°C e 25°C).

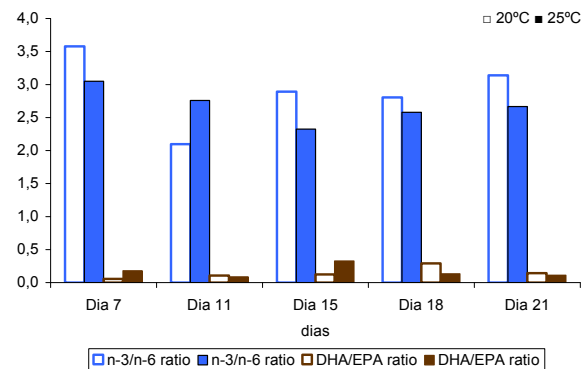


Figura 42 – Relação *n3/n6* e DHA/EPA de *Nannochloropsis oculata* cultivadas em duas temperaturas (20°C e 25°C).

- Metodologia utilizada para determinação de ácidos gordos

As amostras para determinação do perfil em ácidos gordos foram obtidas através de centrifugação, de cerca de 500mL de cada microalga, durante 20 minutos a 3000 r.p.m. Foram lavadas com formiato de amónia para retirar o sal e guardadas em tubos tipo “Eppendorf” em azoto líquido. Posteriormente as amostras foram pesadas, liofilizadas e novamente pesadas, de forma a permitir o cálculo do peso seco da amostra e homogeneizadas com uma mistura de clorofórmio/metanol/água (2/2/1,8), (Bligh & Dyer., 1959). Após a homogeneização recuperou-se a fracção de clorofórmio que contém o extracto lipídico, procedendo-se depois à evaporação do clorofórmio, com azoto, num rotavapor (Heidolph VV2011). O resíduo lipídico é pesado para determinação quantitativa dos lípidos totais e conservado a -20°C em atmosfera de azoto para posterior análise qualitativa e quantitativa dos ácidos gordos.

Após trans-esterificação, com uma solução de  $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  a 14%, os ésteres metílicos (FAME - fatty acid methyl esters) são extraídos através de benzina de petróleo e recuperados e armazenados em isoctano a -20 °C (Metacalfe & Schmitz, 1961). Posteriormente, quando o número de amostra o justificava, os ésteres metílicos foram introduzidos num “auto sampler” e injectados numa coluna capilar (30m sílica fundida, 0,32 Ø I.D.) instalada num cromatógrafo de fase gasosa, Varian Star 3400CX (GLC). Foi utilizado hélio como gás de transporte num fluxo de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , a temperatura foi de 180°C durante 7 minutos e depois de 200°C (com um gradiente de temperatura de  $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) durante um período total de 60 minutos. Quer o injector quer o detector FID foram mantidos a 250 °C. O ácido C19:0, que não existe naturalmente na amostra, foi utilizado como padrão interno para se poderem absolutizar os resultados. A quantificação dos picos foi feita numa “workstation” instalada num computador IBM PS/1.

Os resultados finais foram depois representados sob a forma de um cromatograma.

A identificação dos picos foi efectuada pelo método directo, através dos tempos de retenção de padrões de ésteres de ácidos gordos (FAME). Os resultados foram expressos em proporções relativas (em termos percentuais) de cada



componente e em valores absolutos de ocorrência de cada componente ( $\mu\text{g}/\text{mg}^{-1}$  peso seco).

- Apresentação dos resultados analíticos dos ácidos gordos.

Em todas as determinações de ácidos gordos foi utilizado um padrão interno, o ácido nonadecanóico (C19:0), que não existe naturalmente na amostra, para se poderem absolutizar e expressar os resultados em termos quantitativos.

No caso das microalgas expressa-se o perfil relativo (percentual) de ácidos gordos em relação à massa total dos ácidos gordos determinados, tendo em conta que sendo populações distintas, mesmo para idênticas condições de cultivo, existe variabilidade na concentração celular final e na biomassa obtida no mesmo volume.

No caso do zooplâncton expressa-se quantitativamente o perfil de ácidos gordos em  $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  de peso seco da amostra. Poderemos obter o mesmo perfil percentual de ácidos gordos mas a quantidade ( $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ) de HUFA, de EPA e de DHA incorporada nas presas e fornecida às larvas pode ser distinta.

## Considerações finais

### 1. Crescimento

Verificamos que a concentração final está dependente da concentração inicial, do tempo de cultivo e da espécie de microalga.

### 2. CO<sub>2</sub>

Verificamos que a utilização de CO<sub>2</sub> contribui para manter o pH do meio e é uma importante fonte de carbono para a fotossíntese, para se obter uma maior concentração celular.

### 3. Salinidade

Verificamos que em termos de crescimento as microalgas cultivadas à salinidade de 35 *versus* 25 crescem mais rapidamente atingindo uma maior concentração celular. No entanto, o perfil lipídico não varia consideravelmente.

### 4. Temperatura

Verificamos que em termos de crescimento as microalgas cultivadas à temperatura de 20 °C *versus* 25 °C crescem mais rapidamente atingindo uma maior concentração celular. No entanto, o perfil lipídico não varia consideravelmente.

### 5. Perfil nos principais ácidos gordos

Verificamos que as espécies analisadas do género *Nannochloropsis* spp. apresentavam um melhor perfil em EPA e que as espécies analisadas dos géneros *Isochrysis* spp. apresentavam melhor perfil em DHA e melhor relação DHA/EPA. Verificamos também que o conteúdo em ácidos gordos vai aumentando durante a fase de crescimento apresentando os valores mais altos perto da fase estacionária.

6. O perfil individual destas espécies permitem-nos adaptar a sua utilização de acordo com a espécie de peixe alvo de cultivo. Poderá conjugar-se em diferentes proporções as diferentes microalgas de modo a se obter um perfil em ácidos gordos, nomeadamente em EPA e DHA, o mais adequado ao perfil da espécie que se pretende alimentar.

7. Verificamos também que podem existir diferentes resultados com alterações

dos parâmetros abióticos, do tempo de crescimento e do inóculo utilizado. Estes factores poderão levar a grande variabilidade no cultivo de microalgas entre instituições e dentro da própria (Pernet *et al.*, 2003). Os resultados podem também não ser comparáveis entre Instituições por se partir de populações diferentes.

Deste modo, é necessário otimizar a produção, dentro de cada instituição, de acordo com os objectivos pretendidos – perfil final em ácidos gordos, parâmetros abióticos, espaço a utilizar e produção celular necessária por dia. Deste modo, é importante conhecer o comportamento das espécies com que trabalhamos e necessária uma delicada manutenção e controlo da produção.

Dado que existem naturalmente perfis específicos das espécies de microalgas cultivadas é necessário planear um equilíbrio correcto da algas a utilizar.

## Referências bibliográficas

1. Amat, F., 1985a. Cultivos auxiliares: Zooplâncton. *Primer Curso Teórico Prático sobre Acuicultura*. (Madrid: Marzo-Abril, 1985). Ministerio da Agricultura Pesca y Alimentation, 5: 319-337.
2. Amat, F., 1985b. Cultivos auxiliares: Fitoplâncton. *Primer Curso Teorico-Pratico sobre Aquicultura* (Madrid: Marzo-Abril, 1985). Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentacion, 1: 303-316.
3. Andersen, R. A. & Kawachi, M., 2005, Traditional microalgae isolation techniques. *In* “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 83-100. Elsevier, London, UK.
4. Becker, W., 2004. Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture. *In* “Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology”, (Amos Richmond ed.), pp.380-391. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
5. Bedier, E.; Chatain, B.; Coves, D. & Weppe, M., 1984. Contribution à la production intensive de juvéniles de la daurade *Sparus aurata*. *In* “L’Aquaculture du bar et des sparidés” (G.Barnabé et R.Billard. eds.), pp. 223-236. INRA, Paris.
6. Behrens, P. W., 2005. Photobioreactors and fermentors: The light and the dark sides of growing algae. *In* “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 189-203. Elsevier, London, UK.
7. Borowitzka, M. A., 2005. Culturing microalgae in outdoor ponds. *In* “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 205-218. Elsevier, London, UK.
8. Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K. & Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4): 315-331.
9. Bligh, E. G. & Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
10. Cañavate, J.P. & Fernández-Díaz, C., 2001. Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae *Aquaculture*, 193: 257–269.
11. Caric, M.; Sanko-Njire, J. & Skaramuca, B. (1993) Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture*, 110: 141-150.

12. Carvalho, A. P. & Malcata, F. X., 2005. Optimization of  $\omega$ -3 Fatty Acid Production by Microalgae: Crossover Effects of CO<sub>2</sub> and Light Intensity Under Batch and Continuous Cultivation Modes. *Marine Biotechnology*, 7: 381–388.
13. Carvalho, A. P.; Pontes, I.; Gaspar, H. & Malcata, F.X., 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 358–366.
14. Çelekli, A. & Donmez, G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and *b*-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 183–189.
15. Chen, F., 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* 14 (11): 421– 426.
16. Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R. & Richmond, A., 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture* 195: 35–49
17. De Pauw, N. & Pruder, G., 1986. Use and production of micro-algae as food in aquaculture: practices, problems and research needs. In “*Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives*” (Bilio, M.; Rosenthal, H.; Sinderman, C.J., eds.), pp.77-106. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium.
18. Delaporte, M.; Soudant, P.; Moala, J.; Kraffec, E.; Marty, Y. & Samain, J-F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140: 460–470.
19. Dinis, M.T., 1994. Relatório da disciplina de sistemas de produção em aquacultura: II - O conteúdo do programa., Provas de Agregação, Universidade do Algarve: 185pp.
20. Douča, J.; Straka, F. & Lívanský, K., 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 17: 403–412.
21. Fábregas, J.; Otero, A.; Morales, E.; Cordero, B. & Patino M., 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to artemia. *Aquaculture* 143 (2): 197-204.

22. Fábregas, J.; Maseda, A.; Domínguez, A.; Martinha Ferreira, M. & Otero, A., 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. *Biotechnology Letters* 24: 1699–1703.
23. Faulk, C.K., & Holt, G.J., 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: Live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture* 249, 231-243.
24. Fernández-Reiriz, M.J. & Labarta, U., 1996. Lipid classes and fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed two algal diets. *Hydrobiologia*, 330: 73-79.
25. García-Malea López, M. C.; Sánchez, E. D. R.; López, J. L. C.; Fernández, F. G. A.; Sevilla, J. M. F.; Rivas, J.; Guerrero, M. G. & Grima, E. M., 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 123: 329–342.
26. Grobbelaar, M., 2004. Algal nutrition – mineral nutrition. In “Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology”, (Amos Richmond ed.), pp. 97-115. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
27. Guillard, R. R. L., 2005. Purification methods for microalgae. In “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 117-132. Elsevier, London, UK.
28. Harel, M.; Koven, W.; Lein, I.; Behrens, Y. B.; Stubblefield, J.; Zohar, Y. & Place, A. R., 2002. Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213: 347–362.
29. Harel, M. & Place, A. R., 2004. Heterotrophic production of marine algae for aquaculture. In “Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology”, (Amos Richmond ed.), pp. 513-524. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
30. Hendriks, I.E.; Duren, L.A.V. & Herman, P.M.J., 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 199– 213.
31. Herrero, C.; Cid, A.; Fabregas, J. & Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering* 10: 99-110.

32. Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. & Reitan, K.I., 2001. Development of the pH in the intestinal tract of larval turbot. *Marine Biology*, 139(6): 1159-1164.
33. Hoff, F.H. & Snell, T.W., 1997. Plankton Culture Manual. Florida Aqua Farms, Inc. Florida. 4<sup>th</sup> edition. 142pp.
34. Hoshida, H.; Ohira, T.; Minematsu, A.; Akada, R. & Yoshinori Nishizawa, Y., 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Applied Phycology* 17: 29–34.
35. Howell, B.R., 1973. The effect of unicellular algae on the growth of early larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *I.C.E.S., Fisheries Improvement Committee*, C.M. E.21.
36. Hu, H. & Gao, K., 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters* 25: 421–425.
37. James, C.M.; Al-Hinty, S. and Salman, A.E., 1989. Growth and  $\omega$ 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77: 337-351.
38. Kawachi, M. & Noel, M-H., 2005. Sterelization and sterile technique. In “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 65-81. Elsevier, London, UK.
39. Lafarga-De la Cruz; F.; Valenzuela-Espinoza, E.; Millán-Núñez, R.; Trees, C.C.; Santamaría-del-Ángel, E. & Núñez-Cebrero, F., 2006. Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering* 35: 51–60.
40. Liang, Y.; Beardall, J. & Heraud, F., 2006. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 82:161–172.
41. Lourenço, S.O.; Marquez, U.M.L.; Mancini-filho, J.; Barbarino, E. & Aidar E., 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* .1. comparison of two culture media. *Aquaculture*. 148 (2-3):153-168.
42. Leonardos, N. & Lucas, I.A.N., 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture* 182: 301–315.

43. Masojídek, J.; Koblížec, M. & Torzillo, G., 2004. Photosynthesis in microalgae. *In* “Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology”, (Amos Richmond ed.), pp. 20-39. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
44. Marxen, K.; Vanselow, K. H.; Lippemeier, S.; Hintze, R., Andreas Ruser, A. & Hansen, U-P., 2005. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17: 535–549.
45. Meiser, A.; Schmid-Staiger, U. & Trosch, W., 2004. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricorutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *Journal of Applied Phycology* 16: 215–225.
46. Metacalfe, L. D. & Schmitz, A. A., 1961. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 33 (3): 363.
47. Mourente, G.; Lubian, L.M. & Odriozola, J.M., 1990. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia* 203: 147-154.
48. Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12: 527–534.
49. Muller-Feuga, A.; Moal, J. and Kaas, R., 2003. The Microalgae of Aquaculture. *In* “Live Feeds in Marine aquaculture” (Stottrup, J. G. and McEvoy L.A., eds.), pp.206-252. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
50. Narciso, L.; Pousão-Ferreira, P.; Passos, A. & Luis, O., 1996. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Artemia* sp. with commercial oils during different enrichment periods. *In: Live Food Organisms and Marine Larviculture*, Nagasaki, Japan, September 1-4, Program and abstracts, PR-3, pp 31.
51. Narciso, L.; Pousão-Ferreira, P.; Dores, E. & Passos, A., 1998. Fatty acids of profiles of *Nannochloropsis* sp. during growth. *Portugaliae Zoologica*, 5(2): 11-16.
52. Navarro, N.; Yúfera, M. & García-Gallego, M., 2001. Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. II. Biochemical composition. *Hydrobiologia* 452: 69– 77.
53. Nery, F.; Narciso, L. & Pousão-Ferreira, P., 1995. Fatty acid profile of *Brachionus plicatilis* for sea bream (*Sparus aurata*) larviculture. Mass Rearing of Juvenile Fish, Bergen (Norway), 21-23 Jun 1993. *In* “Selected Papers From a Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish, Bergen, Norway, 21-23 June 1993” (Pittman, K.; Batty, R.S.; Verreth, J., eds.), vol. 201: pp.201.



54. Noronha, F. & Pousão-Ferreira, P., 1990. Produção Intensiva de Microalgas em Aquacultura. In "6º Congresso sobre o Algarve, Albufeira 14-17 Fev. 1990", *Publ. 6º Cong. Algarve*, Vol.1: 351-356.
55. Oie, G.; Makridis, P.; Reitan, K.I. & Olsen, Y., 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153 (1-2): 103-122.
56. Otero, A.; Garcia, D.; Morales, E.D.; Aran, J. & Fabregas, J., 1997a. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26 (3):171-177.
57. Otero, A.; Garcia, D. & Fábregas, J., 1997b. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 465–469.
58. Papandroulakis, N.; Divanach, P.; Anastasiadis, P. & Kentouri, M. 2001. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture International*, 9: 205-217.
59. Peña, M. R. & Villegas, C. T., 2005. Cell growth, effect of filtrate and nutritive value of the tropical Prasinophyte *Tetraselmis tetraathele* (Butcher) at different phases of culture. *Aquaculture Research*, 36: 1500-1508.
60. Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. & Roussy, M., 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. *Aquaculture* 221: 393–406.
61. Pernet, F. & Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310: 73– 86.
62. Poisson, L. & Ergon, F., 2001. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *Journal of Biotechnology* 91: 75–81.
63. Pulz, O & Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 635–648.
64. Reitan, K.I.; Rainuzzo, J.R.; Oie, G. & Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155(1-4): 211-225.
65. Renaud, S.M.; Thinh, L-V.; Lambrinidis, G. & Parry, D.L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of

- tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211: 195–214.
66. Richmond, A., 2004. Biological principles of mass cultivation. In “Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology”, (Amos Richmond ed.), pp. 125-177. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
67. Roncarati, A.; Meluzzi, A.; Acciarri, S.; Tallarico, N, & Melotti, P., 2004. Fatty Acid Composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) According to the Culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration. *Journal of The World Aquaculture Society* 35 (3): 401-411.
68. Rocha, J. M. S.; Garcia, J.E.C. & Henriques, M. H.F., 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20: 237- 242.
69. Salvesen, I.; Reitan, K. I.; Skjermo, J. & Øie, G., 2000. Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* 8: 275–287.
70. Sandnes, J. M.; Kallqvist, T.; Wenner, D. & Gislerød, H. R., 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology* 17: 515–525.
71. Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*, 200: 55-88.
72. Sieracki, M.; Poulton, N. & Crosbie, N., 2005. Automated isolation techniques for microalgae. In “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 101-116. Elsevier, London, UK.
73. Sunda, W. G.; Price, N. M. & Morel F. M. M., 2005. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In “Algal culturing techniques” (Andersen R. A., ed.), pp. 35-63. Elsevier, London, UK.
74. Tandler, A.; Anav, F.A. & Choshniak, I 1995. The effect of salinity on the growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture*. 135: 343-353.
75. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E. & Isambert, A., 2006. Commercial application of microalgae. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87-96.

76. Stottrup, J.G.; Gravningen, K. & Norsker, N.H., 1995. The role of different algae in the growth and survival of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) in intensive rearing systems. In "Selected Papers From a Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish, Bergen, Norway, 21-23 June 1993" (Pittman, K.; Batty, R.S.; Verreth, J., eds.), 201: 173-186.
77. Sukenik, A.; Zmora, O. & Carmeli, Y., 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp.. *Aquaculture*, 117: 313-326.
78. Tomaselli, L., 2004. The microalgal cell. In "Handbook of Microalgal Culture.- Biotechnology and Applied Phycology", (Amos Richmond ed.): 3-19. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
79. Tonon, T.; Harvey, D.; Larson, T. R. & Graham, I.A., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61:15–24.
80. Tredici, M. R., 2004. Mass production of microalgae: photobioreactors. In "Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology", (Amos Richmond ed.), pp. 178-214. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
81. Tzovenis, I.; De Pauw, N., & Sorgeloos, P., 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216: 223–242.
82. Vonshak, A. & Torzillo, G., 2004. Environmental stress physiology. In "Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology" (Amos Richmond ed.), pp. 57-82. Blackwell Science Ltd, Iowa, USA.
83. Wen, Z-Y. & Chen, F., 2002. Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. *Process Biochemistry* 38: 523-529.
84. Wen, Z-Y. & Chen, F., 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21: 273–294.
85. Yúfera, M.; Pascual, E. & Juan, M., 1984. Estudios sobre la producción de algas unicelulares marinas al aire libre. *Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq.* 114:13pp.
86. Yúfera, M. & Pascual, E., 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina." *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.* 119(29): 3-27.
87. Yúfera, M. & Lubian, L. M., 1990. Effects of microalgal diets on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. In "Introduction to Applied

- Phycology” (I.Akatsuka, eds.), pp. 209-227. SPB Academic Publishing bv, The Hague, Netherlands.
88. Zhang, C. W. & Richmond, A., 2003. Sustainable, High-Yielding Outdoor Mass Cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in Vertical Plate Reactors. *Mar. Biotechnol.* 5: 302–310.
89. Zhu, C.J.; Lee Y.K.; Chao, T.M. & Lim, S.H., 1997. Diurnal changes in gross chemical composition and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* tk1 in outdoor closed tubular photobioreactors. *Journal of Marine Biotechnology* 5 (2-3):153-157.
90. Zhukova, N.V. & Aizdaicher, N.A., 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39 (2): 351 356.
91. Zittelli, G.C.; Rodolfi, L.; Biondi, N. & Tredici, M.R., 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261: 932–943.

**ANEXO I**

Composição do Meio de Guillard (modificado):

**A - SAIS - Solução I**

NaNO <sub>3</sub>	300 g L <sup>-1</sup> de água destilada (solução mãe)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g L <sup>-1</sup> de água destilada (solução mãe)
NH <sub>4</sub> CL	20 g L <sup>-1</sup> de água destilada (solução mãe)

- Juntar 1 ml de cada solução mãe a um litro de água destilada.
- Autoclavar a 120° C, durante 20 minutos.

**B - VITAMINAS - Solução II**

Biotina	100 mg L <sup>-1</sup> de água destilada
Tiamina	10 g L <sup>-1</sup> de água destilada
Vitamina B <sub>12</sub>	1000 mg L <sup>-1</sup> de água destilada

(guardar no frigorífico e em frasco escuro).

- Juntar 10 ml de cada solução a um litro de água destilada.

**C - MINERAIS - Solução III**

A solução final de minerais consiste em:

- 800 ml de água destilada
- 100 ml da solução D
- 10 ml da solução A
- 10 ml da solução A

Solução A: Dissolver num litro de água destilada:

30 g de  $\text{Zn SO}_4 \text{H}_2\text{O}$

25 g de  $\text{Cu SO}_4 5\text{H}_2\text{O}$

30 g de  $\text{Co SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$

20 g de  $\text{Mn SO}_4 \text{H}_2\text{O}$

Solução B: Dissolver 50g de  $\text{Fe CL}_3 6\text{H}_2\text{O}$  num litro de água destilada.

Solução C: Dissolver 25g de  $\text{Na Mo O}_4$  num litro de água destilada

Solução D: Dissolver 50g de EDTA num litro de água destilada

Para cada litro de meio de cultura adicionar 1 mililitro das soluções I, II e III.

**ANEXO II**

Composição do Meio de Walne (Modificado):

Volumes pequenos - Soluções inóculo ("stock").

	volume a adicionar
Sais	1 ml L <sup>-1</sup>
Vitaminas	0,1 m L <sup>-1</sup>
Fosfato	1 ml L <sup>-1</sup>
Silicato (só para diatomáceas)	1 ml L <sup>-1</sup>

**SOLUÇÕES STOCK**

1- SAIS: Para 1 litro de água destilada

Cl <sub>3</sub> Fe a 30%	2,0 ml
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	33,6 g
EDTA Na 2H <sub>2</sub> O	52,3 g
NO <sub>3</sub> Na	100,0 g
SO <sub>4</sub> Zn 7H <sub>2</sub> O (2,2g/100 ml)	2,0 ml
SQ <sub>4</sub> Cu 5H <sub>2</sub> O (0,98g/100 ml)	2,0 ml
Cl <sub>2</sub> Co 6H <sub>2</sub> O ( 1g/100 ml)	2,0 ml
Cl <sub>2</sub> Mn 4H <sub>2</sub> O (18g/100 ml)	2,0 ml
Mo O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,68g/100 ml)	2,0 ml

## 2- VITAMINAS: Para 200 ml de água destilada

B <sub>12</sub>	10 mg
B <sub>1</sub>	200 mg

(guardar no frigorífico e em frasco escuro).

## 3- FOSFATO: Para 1 litro de água destilada

PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na 2H<sub>2</sub>O..... 20g

## 4- SILICATO:

Metasilicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 9H<sub>2</sub>O) a 3%

TRIS (solução para manutenção do pH das culturas) - dissolver 125g de TRIS em 400ml de água destilada. Acertar o pH entre 7,1-7,2 (ex.: com ácido clorídrico). Perfazer o volume até 500ml com água destilada. Utilizar 1ml/litro.



**ANEXO III**

## Composição do meio F/2

Mangas - Soluções inóculo ("stock")	Volume a adicionar
Nitrato	1,0 ml L <sup>-1</sup>
Fosfato	1,0 ml L <sup>-1</sup>
Silicato (só para diatomáceas)	0,5 a 1,0 ml L <sup>-1</sup>
Metais	1,0 ml L <sup>-1</sup>
Vitaminas	0,5 ml L <sup>-1</sup>

**SOLUÇÕES STOCK**

1- NITRATO: 7,5g de NO<sub>3</sub>Na /100 ml

2- FOSFATO: 0,565g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na 2H<sub>2</sub>O/100 ml

3- SILICATO: 10ml de SiO<sub>3</sub>Na/100ml

4- METAIS: Preparar em separado e esterilizar:

<u>a) Sais primários</u>	
SO <sub>4</sub> Cu 5H <sub>2</sub> O	0,98g/100 ml
SO <sub>4</sub> zn 7H <sub>2</sub> O	2,2g/100 ml
Cl <sub>2</sub> Co 6H <sub>2</sub> O	1,0g/100 ml
Cl <sub>2</sub> Mn 4H <sub>2</sub> O	18,0g/100 ml
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,68g/100 ml

<u>b) Solução final</u>	
Cl <sub>3</sub> Fe (30%)	6,78 ml
EDTA 2H <sub>2</sub> O	4,827 g
Sais primários	1,0 ml de cada

Completar até 1 litro de água destilada. O pH deve ser aproximadamente 2. Conservar no frigorífico.

5- VITAMINAS (guardar no frigorífico e em frasco escuro):

Vitamina H	0,1 mg/ ml <sup>-1</sup>
Vitamina B <sub>12</sub>	1,0 mg/ ml <sup>-1</sup>

Para 100 ml de água destilada:

1 ml de solução de biotina

0,1 ml de solução de cianocobalamina

Dissolver neste volume 20 mg de Tiamina-CIH

## ANEXO IV

### Preparação do meio sólido para fitoplâncton (Fig.1)

1. Preparar e esterilizar o número de caixas de Petri que necessita (ou utilizar descartáveis já esterilizadas);
2. Colocar meio de Walne num "Erlenmeyer" com 100ml de água salgada filtrada e autoclavar;
3. Colocar 2g de agar num "Erlenmeyer" com 100ml de água destilada e aquecer até  $\pm 95^{\circ}\text{C}$ ;
4. Juntar as duas soluções e deixar arrefecer até  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ;
5. Dividir o meio pelas caixas de Petri (cobrir o fundo) e deixar secar 24 horas;
6. Inocular as placas com a microalga, com um riscado em Z (ver figura);
7. Fechar as placas com parafilm ou equivalente e deixar desenvolver à luz, com o lado que contem o meio de agar na posição superior;
8. Guardar as placas no frigorífico, em posição invertida. Devem ser observadas mensalmente podendo ser conservadas até um ano. Quando necessário fazer nova repicagem.

Alguns dos géneros de microalgas que crescem em meio sólido:

*Tetraselmis* sp.; *Nannochloropsis* sp.; *Isochrysis* sp.; *Dunaliella* sp.; *Chlorella* sp.; *Skeletonema* sp.; *Chaetoceros* sp.; *Thalassiosira* sp. e *Phaeodactylum* sp..

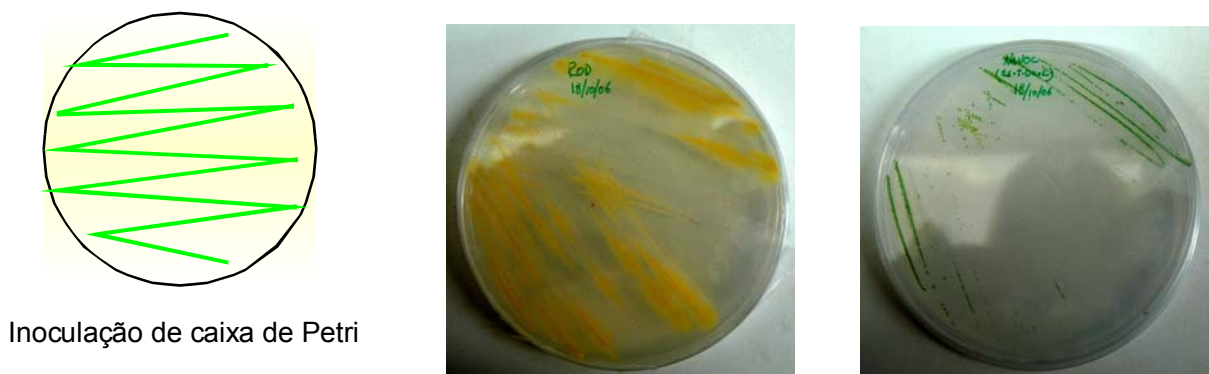


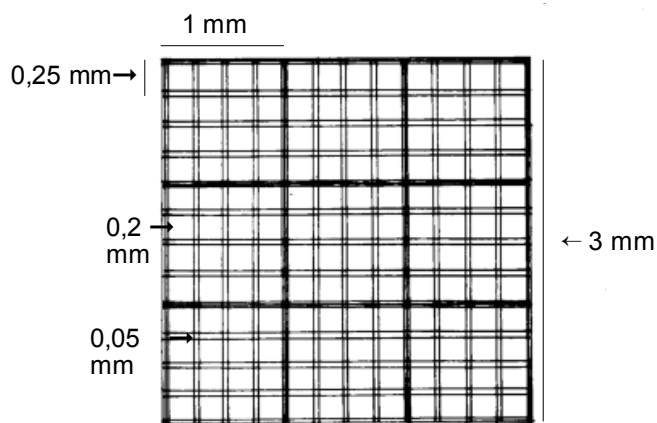
Figura 1 – Exemplo de inoculação e duas caixas de Petri inoculadas com *Rodomonas* sp. e *Nannochloropsis* sp.

## ANEXO V

Procedimentos para a Câmara de Burker  $1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ ml}^3 = 1 \text{ ml}$

1- Quadrados pequenos -  $0,00025\text{mm}^3$  de volume

- ▶ Espécies: *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp.
- ▶ Contar 27 quadrados x  $0,00025\text{mm}^3$  volume
- ▶  $27 \times 0,00025\text{mm}^3 = 6,75 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$



▶  $1000\text{mm}^3$  ..... 1 ml

▶  $6,75 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$  .....  $\chi$

→  $\chi = 6,75 \times 10^{-6} \text{ ml}$

▶  $6,75 \times 10^{-6} \text{ ml}$  ..... nº células contadas

▶ 1ml .....  $\chi$

$$x = \frac{\text{n}^\circ \text{ células contadas}}{6,57 \times 10^{-6}} = \dots \times 10^6 \text{ cel / ml}$$

2- Quadrados médios -  $0,004\text{mm}^3$  de volume

- ▶ Espécies: *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira pseudonana*
- ▶ Contar 48 quadrados x  $0,004\text{mm}^3$  de volume
- ▶  $48 \times 0,004\text{mm}^3 = 0,192 \text{ mm}^3$ 
  - ▶  $1000\text{mm}^3 \dots\dots\dots 1 \text{ ml}$
  - ▶  $0,192 \text{ mm}^3 \dots\dots\dots \chi \quad \Rightarrow \chi = 1,92 \times 10^{-4}\text{ml}$
  - ▶  $1,92 \times 10^{-4} \text{ ml} \dots\dots\dots \text{n}^\circ \text{ células contadas}$
  - ▶  $1\text{ml} \dots\dots\dots \chi$

$$x = \frac{\text{n}^\circ \text{ células contadas}}{1,92 \times 10^{-4}} = \dots\dots \times 10^4 \text{ cel / ml}$$

## ANEXO VI

### - Procedimentos para a Câmara de Neubauer

A câmara ou hematocitômetro de Neubauer é outra câmara de contagem de células utilizada para determinar a concentração celular das microalgas.

#### Procedimentos:

Para se determinar a concentração celular contam-se as células que se encontram nos quadrados grandes A, B, C e D. O volume de água em cada quadrado da câmara (A, B, C ou D) é de 1/10.000ml.

A concentração celular é determinada segundo a equação:

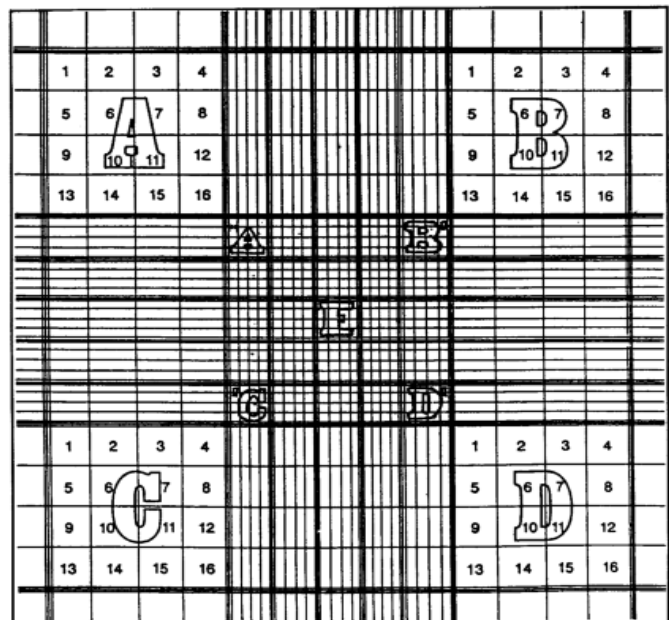
$$\frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4 = \dots 10^6 \text{ cel/ml}$$

Quando as células são de pequenas dimensões ou a concentração celular é muito elevada contam-se os quadrados pequenos - A, B, C, D e E do grupo central (os dos extremos e o central).

Os quadrados pequenos são 25, totalizando 1/10.000ml.

A concentração celular é determinada segundo a equação:

$$\frac{A+B+C+D \times 25}{5} \times 10^4 = \dots 10^6 \text{ cel/ml}$$



Câmara ou hematocitômetro de Neubauer.

## CAPITULO II

### Zooplâncton - rotíferos (*Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformis*)

#### Introdução

A alimentação das fases larvares é considerada um período crítico em aquacultura. As exigências muito restritas da maioria das espécies e a necessidade de simplificação da cadeia alimentar - que permite rentabilizar as estruturas de produção - geram a necessidade de encontrar formas de compromisso entre a adequação nutritiva do alimento e a sua facilidade de obtenção (Yufera & Pascual, 1984).

Tais questões são particularmente prementes no caso de espécies que, como a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) os sargos (*Diplodus* spp.) e o linguado (*Solea senegalensis*), exigem o fornecimento de presas vivas no início da alimentação exógena.

Os cultivos das espécies de zooplâncton utilizadas na alimentação larvar são feitos em grandes volumes, utilizando-se espécies que, sendo adequadas à alimentação larvar, apresentam crescimento rápido e atingem densidades elevadas, garantindo o fornecimento diário e constante de alimento (sem falhas que levariam a mortalidades maciças das larvas).

Nos primeiros ensaios de cultivo de peixes marinhos recorreu-se muitas vezes à colheita de zooplâncton directamente da natureza. No início do século foram realizados ensaios de cultura do linguado com ovos capturados do plâncton tendo sido utilizado zooplâncton natural para alimentar as larvas (Fabre-Domergue & Bietrix, 1905 *in* Dinis, 1986). Actualmente recorre-se por vezes a este método com o fim de encontrar espécies alternativas e mais de acordo com a alimentação natural das larvas e apenas como complemento, visto as quantidades necessárias numa maternidade (“hatchery”) serem muito elevadas e terem de responder às necessidades quantitativas e qualitativas em cada momento.

Este primeiro alimento deverá assim corresponder às seguintes especificações:

- Ter um tamanho adequado à dimensão da boca da larva, em cada estado do seu crescimento,
- Possuir uma flutuabilidade satisfatória e uma movimentação na coluna de água que permita a sua fácil captura pelas larvas planctónicas durante o período em que a sua natação é deficiente,
- Ser fácil de produzir em cativeiro em grandes quantidades, com densidades elevadas, com ciclo de vida curto e com resistência ao maneoio,
- Ter valor nutritivo adequado ou com possibilidade de o modificar através de tecnologia adequada (bioencapsulação) utilizando fontes nutritivamente adequados para as larvas.

## Os Rotíferos

O rotífero, *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (1786), (Figs.1 e 2), não sendo um componente habitual do zooplâncton marinho, é uma espécie eurihalina, cresce entre 2 e 97 de salinidade (Lowe *et al.*, 2005), comumente utilizada devido à sua pequena dimensão (120-300µm), reduzida mobilidade, possibilidade de cultura em elevadas concentrações, manutenção permanente de “stocks” monoespecíficos em laboratório e permitindo a manipulação o seu valor nutricional através da administração de diversos tipos de alimento (Lubzens, 1987, Lubzens & Zmora, 2003; Watanabe *et al.*, 1983a).

A sua utilização em aquacultura teve início no Japão, sendo os primeiros estudos sobre a biologia de *Brachionus plicatilis* devidos a Ito (1960 *in* Amat,1985) e a sua introdução no cultivo da dourada japonesa foi feito por Okamoto (1969 *in* Amat,1985).

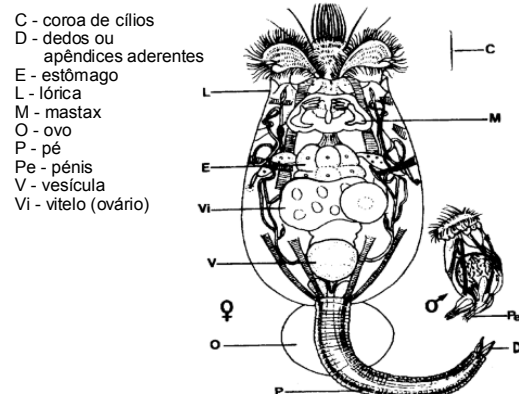


Figura 1 – *Brachionus plicatilis* – fêmea e macho. (Adaptado de Koste, 1980, Pourriot 1989).



Tem-se mostrado como o organismo mais adequado, pelas suas características dimensionais e de capturabilidade para a alimentação das larvas, como primeira alimentação exógena após a reabsorção das reservas vitelinas, até ao momento em que atingem a dimensão mínima a partir da qual se podem alimentar de presas de maiores dimensões, como os náuplios de *Artemia sp.* (cerca de 450µm). O seu polimorfismo, apresentando diferentes dimensões, é importante porque permite utilizar as diferentes estirpes de acordo com a dimensão da boca das larvas.

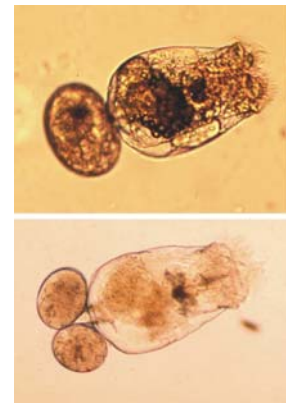


Figura 2 – Fêmeas de *B. plicatilis* com ovos.

## Biologia

Posição sistemática segundo Barnes (1987).

FILO ----- Rotifera

CLASSE ----- Monogononta

ORDEM ----- Ploima

FAMÍLIA ----- Brachionidae

GÉNERO ----- *Brachionus*

ESPÉCIE ----- *Brachionus plicatilis* (O. F. MULLER, 1786)

Os Rotíferos pertencem ao filo de pequenos Metazoários, compostos por um número fixo de células (cerca de um milhar) (Pourriot, 1989) que são encontrados quer em água doce quer em salobra ou salgada. É considerado um organismo eurihalino devido à sua abundância tanto em águas com salinidade entre 2 e 36 como em meios hipersalinos (até 100). No entanto, as taxas óptimas de reprodução situam-se abaixo dos 36 de salinidade (Lowe *et al.*, 2005; Lubzens, 1987).

O corpo é constituído por três partes distintas, a cabeça, o tronco e o pé e encontra-se normalmente coberto por uma cutícula, a lórica (100-350µm). A dimensão da lórica e a forma e comprimento dos espinhos da sua parte final, poderá permitir a distinção entre as várias espécies (Yúfera, 2001). São filtradores e a sua

parte anterior está modificada num aparelho rotativo com cílios (Fig. 1 - coroa de cílios) cujo movimento origina as correntes de água que arrastam os microrganismos de que se alimentam. Estes são triturados por um órgão característico denominado mastax (Fig. 1). Embora possa ser considerado, *grosso modo*, um filtrador não-selectivo, na medida em que é uma espécie eurífaga (Pourriot, 1989), *B. plicatilis* realiza uma escolha qualitativa e dimensional das partículas alimentares (Chotiyaputa & Hirayama, 1978, Hansen, *et al.* 1997). Segundo Ruttner-Kolisko (1986) qualquer objecto até 15µm pode ser por ele ingerido.

O diâmetro máximo (*DM*, em µm) das partículas ingeridas apresenta uma relação linear com o comprimento máximo da lórica (*CM*, em µm), que é por sua vez função da abertura da boca (Hino & Hirano, 1980):

$$DM = 0.090 CM + 0.033$$

A taxa de filtração depende das condições físico-químicas, das características do alimento e do estado fisiológico do organismo.

Os rotíferos são animais planctónicos tendo como habitat preferencialmente dois tipos de meios (Pourriot 1989):

meios abertos: zonas de estuários e zonas litorais marinhas onde se encontram frequentemente diversas espécies do género *Synchaeta*, cuja ecologia é ainda mal conhecida e que não é ainda cultivado

meios fechados: (temporariamente ou em permanência): zonas lagunares e meios continentais, tais como lagos salgados e lagunas litorais. Nas zonas de águas salobras encontram-se as espécies *Brachionus plicatilis* e a levedura *Hexarthra fennica*.

Os rotíferos (*Brachionus plicatilis*) apresentam várias vantagens como alimento:

- São fáceis de cultivar e reproduzem-se rapidamente. Estima-se que em condições favoráveis a população pode duplicar cada um a cinco dias. Segundo Dhert (1996) cada fêmea (fig. 3) pode gerar entre 0,7 e 1,4 descendentes por dia. O seu ciclo de vida tem uma duração média entre 3,3 e 4,4 dias a 25°C e, dependente da temperatura, cada fêmea atinge a maturidade em 0,5 a 1,5 dias, podendo produzir ovos em cada 4 horas e 10 gerações.
- São de pequenas dimensões, com natação lenta, podendo ser aceites como primeiro alimento, por larvas de pequenas dimensões. Atingem o seu tamanho máximo em cerca de dois dias (Korstad *et al.*, 1989)
- Têm valor nutritivo, que pode ser alterado por forma a adequá-lo às larvas que se estão a cultivar. Não sendo filtradores selectivos ingerem todas as partículas de dimensão adequada, o que permite a sua bioencapsulação (enriquecimento) com microalgas ou com produtos comerciais ou emulsões laboratoriais com características nutritivas particulares. Isto permite o seu cultivo em elevadas densidades com produtos de baixo custo como a levedura de padeiro *Saccaromyces cerevisiae*, sendo bioencapsulados algumas horas antes do seu fornecimento, com produtos com as características nutritivas essenciais para as larvas a que se destinam. No entanto, em presença de diferentes espécies de microalgas, parecem apresentar preferência por algumas em detrimento de outras (Hotos, 2002).
- São resistentes a variações de salinidade e temperatura e podem ser cultivados a densidades de cultivo entre 500 e 2000 rotíferos.mL<sup>-1</sup>

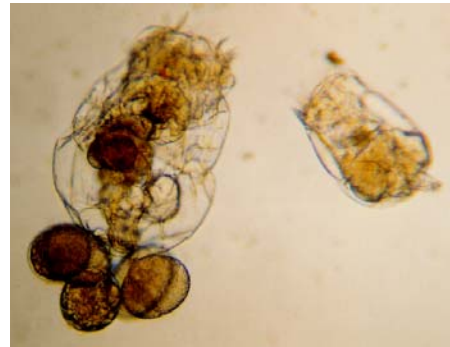


Figura 3 – Macho e fêmea de *B. plicatilis*.

Utilizam-se duas espécies:

- *Brachionus rotundiformis*, que se designava por estirpe S, de menores dimensões (120µm a 160 µm), e onde 80% da população tem menos de 150µm de tamanho. Nesta estirpe a lórica é redonda com espinhos anteriores pontiagudos, e a taxa de crescimento óptimo situa-se bastante acima dos 20° C (26° a 30°C).

Dentro dos *B. rotundiformis* considera-se a existência de uma estirpe SS, identificada em zonas tropicais, cujos exemplares são de menores dimensões e que tem o seu crescimento óptimo entre 28 °C e 35 °C (Assavaaree *et al.*, 2003).

- *Brachionus plicatilis*, que se designava por Estirpe L, de maiores dimensões (250µm a 300µm) e onde apenas 1 a 2% dos animais são menores que 150µm. Aqui a lórica é mais alongada e com os ângulos entre os espinhos mais agudos, mostrando melhor tolerância a temperaturas inferiores a 20°C, com a taxa de crescimento óptimo entre 18° e 25°C.

Os termos estirpe L e estirpe S continuam a aparecer na bibliografia e a ser utilizados correntemente para designar os rotíferos grandes (*B. plicatilis*) e os pequenos (*B. rotundiformis*).

A estirpe S. (*Brachionus rotundiformis*) dadas as suas dimensões, é utilizada nos primeiros estados larvares. No caso da dourada e outros esparídeos, devido à pequena dimensão da larva, é utilizada até cerca do oitavo dia de idade (5° de alimentação a 20±1°C) sendo gradualmente substituídos pela estirpe L. (*Brachionus plicatilis*), de acordo com o plano alimentar estabelecido.

Quando as duas estirpes (espécies) aparecem misturadas numa cultura é possível separá-las utilizando diferentes temperaturas. Subindo ou descendo a temperatura podemos conseguir isolar a estirpe S ou a L (Dhert, 1996).

No entanto, nem sempre do ponto de vista operacional existe a possibilidade de manter os dois cultivos em paralelo, optando-se pelo cultivo misturado, separando-se por dimensão (com filtros adequados) antes de os fornecer às larvas.

Actualmente, procura-se obter novas estirpes, com o cruzamento de estirpes da mesma espécie mas de populações diferentes, com vista a obter rotíferos com características mais adequadas à aquacultura. Estirpes para determinadas condições abióticas, de acordo com o local onde se pretendem produzir, espécie de larva de peixe ou fase do cultivo a que se destinam (Kotani *et al.*, 2006). Refira-se que diversos estudos têm mostrado que os rotíferos *B. plicatilis* têm diferenças morfológicas e genéticas entre as diversas estirpes mas que estas não estão isoladas do ponto de vista reprodutivo, pelo que se consideram da mesma espécie. (Kotani & Hagiwara, 2003).

Do ponto de vista de gestão, controlo e planeamento da produção estão em curso estudos de modelação da população de *Brachionus plicatilis* (com base em modelos energéticos), com vista a obter um modelo que facilite a produção de rotíferos em aquacultura (Alver *et al.*, 2006).

### **Ciclo de vida de *Brachionus plicatilis***

*Brachionus plicatilis* reproduz-se na maioria das vezes por via partenogénica (Fig.4). É a mais comum e as fêmeas (partenogénicas ou amícticas) formam ovos diplóides, não fecundados, que dão origem a novas fêmeas. Este ciclo ameiótico pode ser interrompido por fases de reprodução sexuada desencadeadas por factores de origem exógena (temperatura, alimentação, densidade da população, etc.) ou endógena (idade) (Lubzens & Zmora, 2003; Pourriot, 1989).

As fêmeas sexuadas ou mícticas, por os seus ovos serem submetidos a meiose, formam ovos haplóides que dão origem a machos na ausência de fecundação ou ovos de resistência quando fecundados.

Os ovos de resistência, em diapausa, possuem um córion espesso e ornamentado e a sua eclosão é diferenciada, assegurando a sobrevivência da espécie em condições desfavoráveis (seca, frio intenso). Estes ovos dão sempre origem a uma fêmea amíctica iniciando desta forma um novo ciclo partenogénico (Pourriot, 1989).

Em resumo, a produção deste tipo de ovos de resistência depende da:

- produção de fêmeas míticas;
- actividade e fertilidade dos machos;
- capacidade das fêmeas para a fecundação;
- fecundidade das fêmeas fertilizadas.

A produção de fêmeas míticas de *Brachionus plicatilis* é devida principalmente a três factores:

- Salinidade, a reprodução

sexuada é favorecida pelas baixas salinidades (10-15) ou pela deslocação de altas para baixas salinidades;

- Densidade da população, muito baixas ou muito altas densidades podem afectar o crescimento da população;

- Alimentação, não só do ponto de vista qualitativo como quantitativo.

Em termos de produção em grande escala devemos evitar as condições que causem reprodução sexuada e otimizar as que beneficiem a reprodução partenogénica, de forma a maximizar a produção de rotíferos.

As microalgas utilizadas na alimentação de rotíferos afectam a taxa de crescimento assim como a sua composição bioquímica. Uma alimentação constituída por *Chlorella spp.* ou *Nannochloropsis spp.* produz uma mistura das diferentes formas (fêmeas míticas, amíticas e ovos de resistência) superior à que se obtém com *Dunaliella tertioleta* ou *Platymonas suecica* ou com diatomáceas

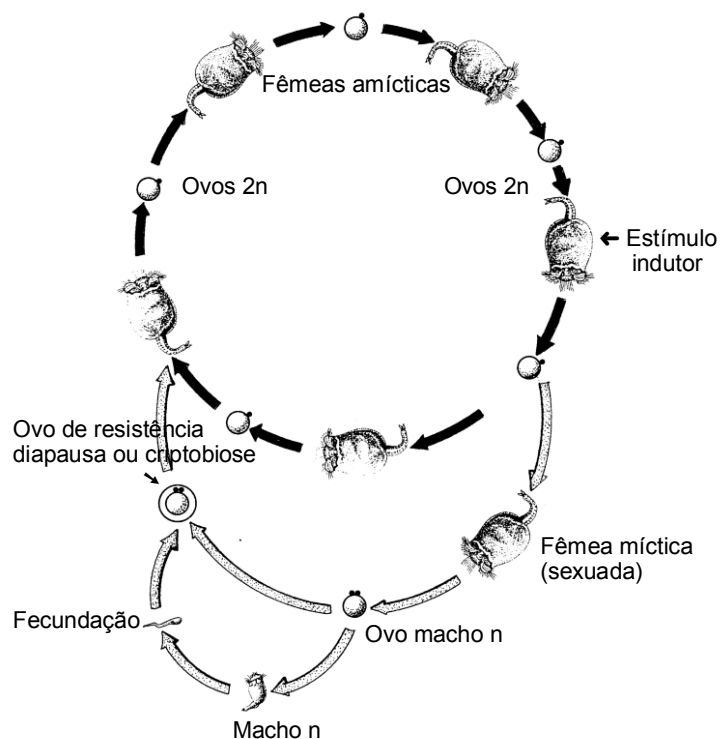


Figura 4 – Ciclo de vida partenogénico e sexual de rotíferos. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

(*Phaeodactylum* sp.). A mais forte resposta de produção de fêmeas míticas foi obtida com uma mistura de *Chlorella* com uma Cyanophyceae do género *Schizothrix*, enquanto que com levedura (um dos métodos correntes de alimentação utilizados em produção de rotíferos em grandes volumes) há uma ocorrência maior de ovos de resistência (Pourriot, 1989). Por outro lado, segundo Dhert (1996), dentro da mesma estirpe, os rotíferos alimentados com levedura são normalmente maiores que os alimentados com microalgas.

Factores como a densidade, a qualidade da água, a temperatura, a disponibilidade e a qualidade do alimento vão afectar o número de ovos por fêmea numa população (Sarma, *et al.*, 2005).

Os ovos de resistência de *Brachionus plicatilis*, em estado de diapausa, eclodem após um tempo de latência obrigatório de cerca de um mês, segundo dois processos diferentes:

- Eclensões graduais e espaçadas num período longo,
- Eclensões maciças e síncronas num curto intervalo de tempo.

Este sincronismo surge apenas após um tratamento específico de armazenamento dos ovos de resistência em condições óptimas (obscuridade, temperatura baixa e salinidade alta) e sob acção de um estímulo preciso inverso dos precedentes, ou seja, luz, cuja presença é indispensável à interrupção da diapausa, elevação de temperatura de 14 para 22 °C e salinidade média de 12 a 16.

Os custos e morosidade da produção de microalgas levaram procura de alimentos alternativos para o cultivo de *B. plicatilis*. Os alimentos mais comuns utilizados na alimentação de rotíferos são leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* sp.), leveduras enriquecidas com óleos em laboratório ou comerciais (ex:  $\omega$ 3 yeast60<sup>2</sup> Rocult<sup>2</sup>, Culture Selco<sup>3</sup>), algas secas em pó e microalgas. Alguns produtos comerciais como o Culture Selco<sup>®</sup> apresentam uma gama de diferentes designações (ex: Culture Selco<sup>®</sup> 3000, Culture<sup>®</sup> Selco Plus) consoante a sua formulação. A utilização nas produções em grande escala de leveduras - individualmente, em conjunto com outros produtos ou enriquecidas em óleos com ácidos gordos polinsaturados - está actualmente generalizada. Algumas das espécies de microalgas que têm dado muito bons resultados no cultivo de rotíferos

---

\* <sup>1</sup>  $\omega$ 3 yeast60<sup>®</sup>, Bernaqua, Olen, Belgium.; <sup>2</sup> Rocult<sup>®</sup> Dana Feeds A/S, Denmark; <sup>3</sup> Culture Selco<sup>®</sup>, INVE Aquaculture NV, Baasrood, Belgium

são os géneros *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Monochrysis* sp., *Nannochloris* sp., *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp. e *Phaeodactylum* sp. Contudo os bons resultados referidos estão dependentes dos parâmetros zotécnicos e ligados à tecnologia do cultivo tais como a quantidade e a qualidade de alimento, o período de intervalo de fornecimento de alimento, a temperatura, a salinidade e a qualidade da água que podem afectar o crescimento da população cultivada, assim como a produção de ovos.

### Tecnologia de cultivo

O ciclo de vida dos rotíferos (fig. 4) está totalmente controlado em laboratório. As estirpes são seleccionadas a partir de populações naturais. As fêmeas míticas são isoladas ao microscópio e retiradas, seleccionando-se para utilização os clones de reprodução partenogénica exclusiva ou semi-exclusiva. A produção inicia-se a partir de uma cultura inóculo (“stock”) que se faz crescer em volumes sucessivamente maiores (Figs. 5, 6 e 7).



Figura 5 – Inóculos de *B. plicatilis*.



Figura 6 – Cultivos iniciais de *B. plicatilis* em microalgas.



## Técnicas normalmente utilizadas

### **Culturas stock - Conservação das estirpes**

As estirpes, cultura inóculo (“stock”) são conservadas em tubo de ensaio de 40 mL, numa microalga em crescimento exponencial e sem arejamento. Permanece deste modo, a uma temperatura entre 15 e 18 °C para assegurar uma reprodução mínima, salinidade entre 20 e a do meio de cultura enquanto existir alimento. Sempre que necessário, quando se encontram sem microalgas (quase transparentes) são parcialmente repicados, retirando-se com uma pipeta esterilizada, o sobrenadante onde se encontra grande parte dos rotíferos, para outro tubo de ensaio. Este deve estar devidamente esterilizado e com a microalga (normalmente *Nannochloropsis* sp. ou *Tetraselmis suecica*), após o que se repicam os rotíferos não devendo, nestas condições, a sua concentração ultrapassar os 30 ind.mL<sup>-1</sup>.

Os remanescentes são transferidos para um “erlenmeyer” de 250 mL sem arejamento, constituindo estes o ponto de partida para iniciar maiores volumes. Permanece assim até a cultura ter atingido o seu crescimento máximo, normalmente quando já foi consumido todo o alimento, repetindo-se as tarefas anteriores transferindo para outros recipientes.

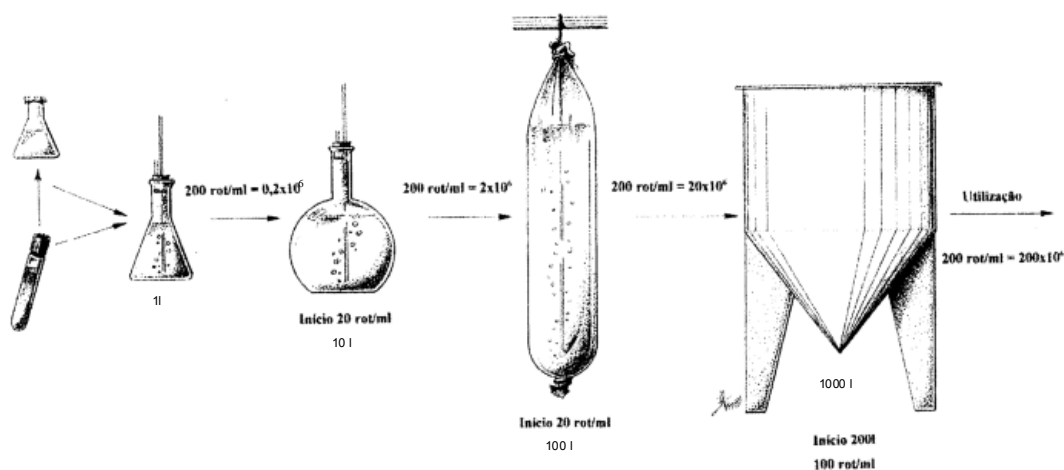


Figura 7 - Esquema de produção de rotíferos. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

## **Culturas intermédias**

Os volumes intermédios (2-10 L) são inoculados com concentrações iniciais entre 20 e 50 rot.mL<sup>-1</sup> e são produzidos de duas formas: método descontínuo ou semi-contínuo.

### Método descontínuo:

a) Inicia-se a cultura com um pequeno volume que vai sendo incrementando, de dois em dois dias, com a introdução de microalgas. Se a concentração de rotíferos for elevada, o consumo de microalgas é mais acentuado pelo que se incrementa o volume diariamente, até se atingir o volume final. Quando a concentração pretendida é atingida procede-se a uma repicagem para volumes de cultivo iguais (manutenção) ou superiores (para entrada em escala de produção).

b) Os rotíferos são introduzidos num recipiente já com o volume total em microalga em fase de crescimento exponencial, sendo repicados quando atingem a concentração desejada ou quando o alimento se esgota.

Assim, ou mantemos a concentração dos rotíferos acrescentando volume ao meio de cultivo, na proporção do crescimento da população ou iniciamos o cultivo, com uma concentração determinada de rotíferos, mas com volume do meio final (volume total), esperando-se pelo aumento da concentração da população.

### Método semi-contínuo:

Neste caso utiliza-se a técnica que se descreveu para o método anterior mas, quando atingem a concentração desejada ou quando o alimento se esgota, vai-se retirando a produção, normalmente 1/4 do volume, acrescentando-se igual volume de alimento (microalga). Este método é interrompido quando as condições do meio se degradam, iniciando-se de novo o cultivo. Deste modo, é possível manter uma cultura durante bastante tempo, utilizando as produções sucessivas para iniciar novas culturas.

## **Culturas de pré-produção**

São realizadas em tubos de PVC, fibra de vidro ou sacos de polietileno, transparentes, de 20 a 80 L, onde previamente se iniciou uma cultura de microalgas. A inoculação faz-se normalmente quando a microalga está na fase final de crescimento, perto de atingir o estado estacionário, com concentrações iniciais entre 20 a 100 rot.mL<sup>-1</sup>, de acordo com o tempo que desejamos para atingir a concentração máxima de rotíferos. O aparecimento de espuma na cultura indica que a multiplicação da população se iniciou, ao mesmo tempo que a alga é consumida. Quando a microalga começa a desaparecer e os rotíferos ainda apresentam bastantes ovos utiliza-se o volume total da manga para inoculação de tanques de produção. Se não se utilizarem os rotíferos na altura certa a população começa a envelhecer, não produzindo ovos devido à ausência de alimento pelo que não deve ser utilizada pois o resultado será que o tanque inoculado não vai crescer, pelo menos em tempo útil.

Por vezes, quando se utilizam volumes mais pequenos, em fibra de vidro ou PVC, utiliza-se o método semi-descontínuo.

Estes cultivos de pré-produção correspondem à fase de aumento do volume da cultura e constituem a base para a inoculação de grandes volumes (500 a 3.000 L). Nos grandes volumes não se pode começar com inoculações com pequenas concentrações, porque o meio de produção altera-se antes de ser atingida uma concentração desejada e obrigaria a um maior número de tanques para satisfazer as necessidades de produção.

## **Cultivo intensivo em grandes volumes**

O objectivo final das culturas de rotíferos é o de providenciar diária e continuamente a produção de quantidades apreciáveis de alimento para as larvas. Como em outras áreas da produção os grandes volumes estão directamente relacionados com a experiência, que permite gerir a produção de forma a cobrir as necessidades ininterruptamente. Assim, no Japão fazem-se cultivos intensivos de

rotíferos em volumes de 300 m<sup>3</sup>, enquanto que na Europa os volumes mais vulgarmente utilizados são até 3000 L.

A produção faz-se a partir de uma manga com uma concentração elevada, normalmente acima dos 300 rot.mL<sup>-1</sup>, que serve para inocular um tanque. Este inicia-se com 1/5 do volume final, composto por:

- Volume, total ou parcial, da manga com rotíferos;
- Microalga (ex: 20-30 L ou 5 a 10% do volume);
- Água salgada que deve ser esterilizada por lâmpadas de ultra-violeta e filtrada através de filtros de malhagem decrescente até 1µm por forma a evitar contaminações por ciliados. Estes podem-se tornar bastante abundantes e vão competir com os rotíferos pelo alimento.

Uma estratégia referida por Cheng *et al.*, (2004) para controlar os “blooms” do ciliado *Euplotes vannus*, bastante comum nos cultivos de rotíferos, é utilizar microalgas que inibam o seu desenvolvimento.

Por vezes utilizam-se esteiras, adesivas ou porosas (vulgo “esfregão verde”) ajudar a limpar partículas e a controlar o “blooms” de ciliados dos tanques de rotíferos.

- Água doce para reduzir a salinidade para 20 (melhora a produção ovos);
- No início junta-se vitamina B<sub>12</sub> (1ml.L<sup>-1</sup> de uma diluição de 150mg.L<sup>-1</sup> água destilada - 150ppm), com o objectivo de estimular a taxa de crescimento da população.

A concentração inicial de rotíferos deve ser entre 50 a 100 rot.mL<sup>-1</sup>.

Este cultivo vai ser alimentado ou com produtos comerciais ou com levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) e microalga (nos dois primeiros dias). Utiliza-se levedura de padeiro devido à sua reduzida dimensão (5-7 µm), por ser de menor custo, de mais fácil manuseamento e armazenamento (no frigorífico), podendo ser obtida em qualquer padaria que confeccione pão. A sua utilização em substituição das microalgas evita filtrações sucessivas para reduzir o volume e fornecer alimento, o que implicaria uma muito maior produção de microalgas tornando-se um processo com custos demasiado elevados.

Hirayama & Watanabe (1973 *in* Bennett & Boraas, 1988) demonstraram que a utilização de levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas mistas com *Chlorella* sp. permite aumentar até 55% a taxa de reprodução dos rotíferos, comparativamente a uma dieta unialgal. Segundo os mesmos autores, Hirayama & Watanabe (1973 *in* Bennett & Boraas, 1988), o sucesso da produção em massa de *B. plicatilis* alimentado com levedura é devido à presença de suplementos nutritivos libertados pela decomposição da levedura e também por fitoplâncton e bactérias, que crescem nos tanques de cultivo, utilizando os produtos de decomposição como fonte nutritiva. O fornecimento de nutrientes, tais como vitamina B<sub>12</sub>, na suspensão de levedura aumenta os valores da taxa de crescimento da população de rotíferos e da taxa de eclosão dos ovos (Hirayama & Funamoto, 1983; Yu *et al.*, 1989). Melhores resultados nos cultivos de *B. plicatilis* foram obtidos com a denominada “ $\omega$ -yeast” (Watanabe *et al.*, 1983b) que consiste em fornecer um emulsionado de óleo de lula ou fígado de bacalhau juntamente com a levedura. Estes óleos asseguram o fornecimento de ácidos gordos essenciais (n-3) aos rotíferos. Actualmente, existe uma vasta gama de produtos e emulsionados de óleos assim como emulsões preparadas em laboratório utilizados no enriquecimento de rotíferos (Dhert *et al.*, 2001; Andoa *et al.*, 2004).

Na produção em grandes volumes deverão utilizar-se microalgas apenas nos dois primeiros dias, durante a fase de arranque da cultura, de modo a evitar a acumulação de microalgas mortas e floculadas que irão dificultar, na altura da colheita, os processos de filtração e lavagem dos rotíferos.

## **Produção**

### Qualidade da água

- A salinidade pode situar-se entre 20 e 38. No entanto, quando se utilizam leveduras (ex: *Saccharomyces cerevisiae*) deve ser de 20 (no máximo 25), um vez que a partir deste valor as leveduras morrem, não servindo de alimento, poluindo o meio de cultivo. Também para assegurar uma melhor taxa de crescimento e de produção de ovos de

*B. plicatilis* a salinidade deve situar-se próxima de 20 (Lowe *et al.*, 2005).

- A temperatura no caso de *B. rotundiformis* (estirpe *S*) deve situar-se entre os 28 °C e 30 °C (acima deste valor começa a tornar-se difícil manter o oxigénio do meio), de modo a obter-se um crescimento rápido da população. Para *B. plicatilis* (estirpe *L*) a temperatura deve situar-se entre 22 °C e 25 °C. Temperaturas demasiado elevadas impedem o crescimento e levam a um aumento do metabolismo e do consumo do alimento. Isto implica um maior número de refeições, com menor quantidade de cada vez, modo a evitar a poluição do meio por excesso de alimento ou a períodos de fome da população.
- O oxigénio dissolvido deve encontrar-se próximo da saturação (>5mg.L<sup>-1</sup>) e deve ser regularmente controlado, principalmente quando se atingem grandes concentrações de rotíferos. Nos cultivos em grandes densidades é usual injectar oxigénio puro. Actualmente produzem-se rotíferos em muito altas densidades (>5000 rot.mL<sup>-1</sup>) utilizando sistemas de recirculação com recurso a ozono (Dhert *et al.*, 2001).
- Os níveis de amónia não-ionizada (NH<sub>3</sub>), devem situar-se abaixo de 1mg.L<sup>-1</sup> (Dhert, 1996, Lubzens and Zmora, 2003). Desta forma, o pH do meio deverá ser controlado - mantendo-se entre 7,5 e 8,5 - tendo em conta que a toxicidade da amónia não ionizada (NH<sub>3</sub>) está dependente do pH, da temperatura e da salinidade. Os mesmos autores consideram aceitáveis níveis de amónia total e nitritos entre 6 e 10mg.L<sup>-1</sup>.

Com vista a contribuir para a estabilidade dos cultivos de rotíferos, alguns produtos, como GABA (aminoácido neurotransmissor, ácido gama-aminobutírico) - 50mg L<sup>-1</sup>, têm sido utilizados com algum sucesso, contribuindo para o crescimento da população e actuando como anti-estressor quando as condições de cultivo não são as ideais (como o excesso de amónia ou a diminuição do alimento) (Araujo.& Hagiwara, 2005; Gallardo *et al.*, 1997; Gallardo *et al.*, 1999). Mesmo durante o

enriquecimento com diferentes produtos ou emulsões e elevadas densidades a utilização de GABA aumenta a actividade natatória e a reprodução dos rotíferos (Gallardo *et al.*, 2001).

### Alimentação

Um dos alimentos tradicionalmente utilizados é a levedura de padeiro (*Saccaromyces cerevisiae*). A levedura, previamente dissolvida em água doce, é fornecida várias vezes ao dia (3 a 5) de modo a ser consumida, a fim de reduzir a poluição do meio e a consequente alteração da qualidade da água. A quantidade de levedura fornecida por dia é calculada em função da concentração de rotíferos, temperatura da água e relacionada com o estado da cultura mas segue de modo geral o seguinte esquema, desde o início da cultura:

50-100 rot.mL<sup>-1</sup> → 3-4 g/10<sup>6</sup> rot.

100-150 rot.mL<sup>-1</sup> → 1-2g/10<sup>6</sup> rot.

150-250 rot.mL<sup>-1</sup> → 0,5-1g/10<sup>6</sup> rot.

< 250 rot.mL<sup>-1</sup> → variável

Em caso de grandes concentrações de rotíferos, a quantidade máxima de levedura por tanque depende da experiência do operador, não existindo uma receita fixa, que não deve deixar degradar demasiado o meio.

O uso de levedura tem como consequência um aumento da poluição nos tanques de cultivo. O sintoma mais comum desta poluição é a formação de espuma na superfície do tanque, que corresponde à presença de albumina proveniente da matéria orgânica.

Como alternativa à levedura de padeiro, em grandes produções nas maternidades, utilizam-se leveduras enriquecidas com vitaminas e ácidos gordos (HUFA) sob várias denominações comerciais, como referido anteriormente. Um dos produtos utilizados é o “Culture Selco<sup>®</sup>”, (Tab.1), sendo que neste caso o cultivo poderá ser feito em água salgada (salinidade 35) ou com diluição, salinidade 25 (Dhert, 1996; Sorgeloos, 1995). Os valores apresentados referem-se á estirpe *L* (*B.*

*plicatilis*) pelo que deverão ser corrigidos, para menos, para a estirpe *S* (*B. rotundiformis*). A utilização deste produto não invalida a posterior bioencapsulação dos rotíferos com um produto com diferente perfil nutritivo.

Tabela 1 - Utilização de “Culture Selco<sup>®</sup>”, (Dhert, 1996).

<b>Rotíferos</b> densidade por mililitro (estirpe L)	<b>Culture Selco<sup>®</sup></b> por 10 <sup>6</sup> rotíferos.dia <sup>-1</sup> (em grama)	<b>Culture Selco<sup>®</sup></b> por m <sup>3</sup> .dia <sup>-1</sup> (em grama)
100-150	0,53	53-80
150-200	0,47	70-93
200-250	0,40	80-100
250-300	0,37	92-110
300-350	0,33	100-117
350-400	0,30	105-120
400-450	0,27	107-120
450-500	0,23	105-117
>500	0,25	125
>1200	0,20	240

Diariamente deve ser feita uma limpeza ao fundo do tanque acompanhada por uma paragem, por alguns minutos, do arejamento e de uma purga de fundo.

O cultivo em paralelo de microalgas destinadas à manutenção de inóculos de rotíferos é de extrema importância de modo a não quebrar a sequência de produção. Deverá ser dada especial atenção a esta integração de cultivos, tendo em conta os diferentes tempos de crescimento entre microalgas e rotíferos (Fig. 8).

#### Cálculo da densidade e crescimento

O cálculo do número de rotíferos faz-se diariamente com a contagem do número de rotíferos, do número de fêmeas com ovos e número de ovos por fêmea através de 3 a 5 amostras de 1ml. Desta forma calcula-se o crescimento diário da população e pelo número de ovos poderá prever-se se a mesma continuará a crescer ou se vai diminuir (eventualmente reduzir significativamente).



A taxa de reprodução dos cultivos é determinada pela seguinte equação (Lubzens & Zmora, 2003):

$$r = \frac{1}{T} \ln(N_1 - N_0)$$

Em que:

T= duração do cultivo em dias

N<sub>0</sub> = número inicial de rotíferos e ovos

N<sub>1</sub> = número total de rotíferos e ovos após T dias de cultivo

Segundo os mesmos autores o valor de *r* para *Brachionus plicatilis* varia normalmente entre 0,23 e 1,15 e para *B. rotundiformis* varia normalmente entre 0,54 e 1,37 dependendo da alimentação, da temperatura e da salinidade.

Segundo Lowe *et al.*, (2005) a maior taxa de crescimento de *Brachionus plicatilis* ocorre, a uma temperatura de 25 °C, com salinidade de 16 e o maior número de ovos amícticos por fêmea (1.41) a salinidade de 20. Estes dois parâmetros (crescimento e produção de ovos) descem rapidamente à medida que a salinidade aumenta. Considera como salinidade ideal valores entre 15 e 20 para se obter o maior crescimento da população.

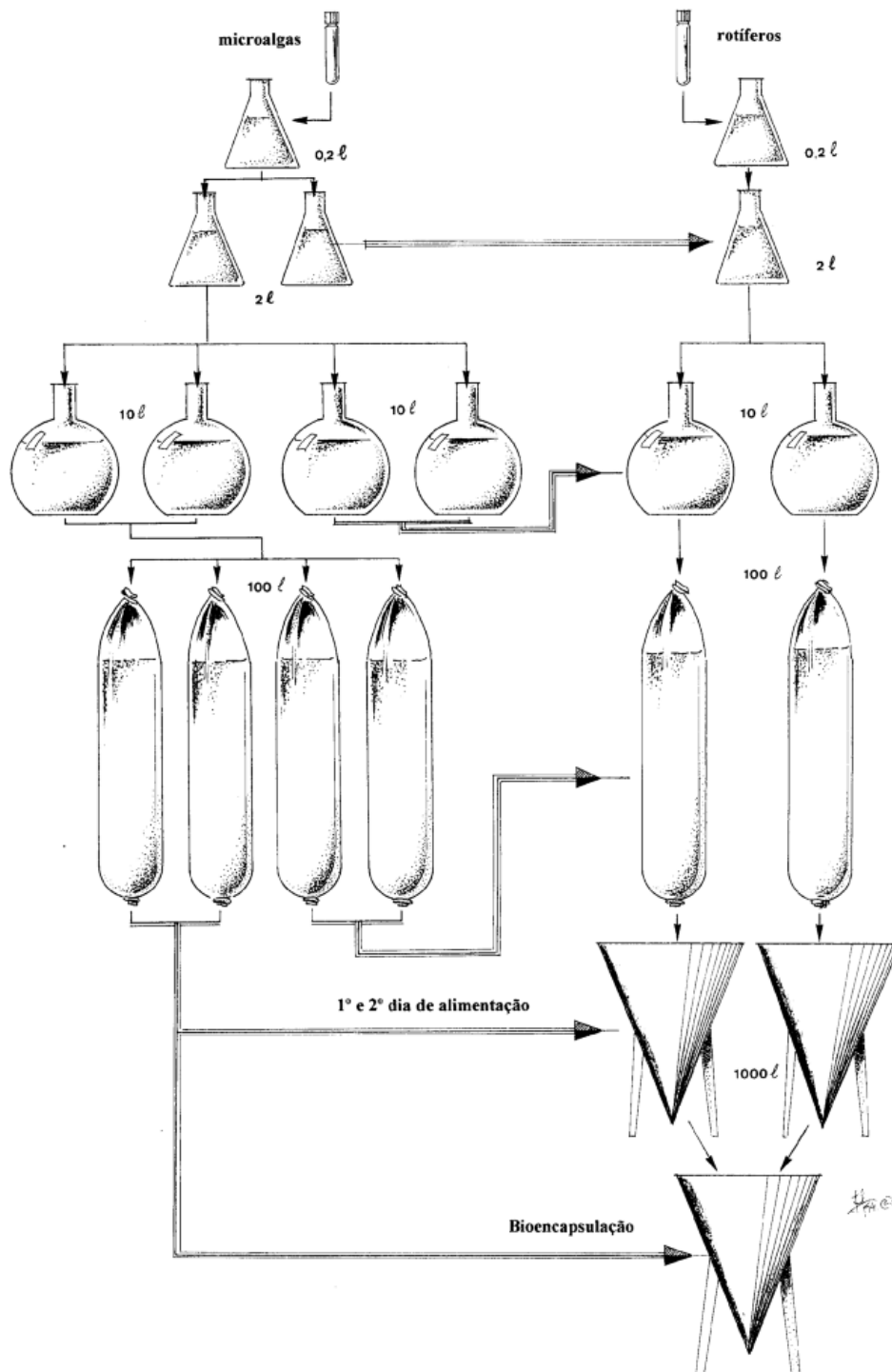


Figura 8 – Cultivo integrado de microalgas e rotíferos. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

### Colheita e utilização

A cultura está pronta a utilizar ao fim de 5-7 dias, normalmente quando se dá um "bloom" na produção, podendo ser utilizada na totalidade, ou em método semi-contínuo, com reposição durante 1 ou 2 dias enquanto houver crescimento. O estado de envelhecimento de uma cultura é dado pela quantidade de fêmeas com ovos. Quando esta começa a diminuir, a cultura deverá ser utilizada pois é sinal que o tanque provavelmente está com demasiada amónia e nitritos, e em 1 ou 2 dias estará sem rotíferos.

O número de ovos por fêmea é, deste modo, uma ferramenta útil na produção para determinar a taxa de crescimento, prever oscilações e o declínio da população (Sarma, *et al.*, 2005).

Como este tipo de cultivo é feito com a utilização rotativa dos tanques, atraso na utilização de um tanque implica o atraso do seu início com novo cultivo e uma quebra no ciclo produtivo, que poderá ter consequências desastrosas.

Estes são os princípios básicos da metodologia de produção que, contudo, pode e deve ser adaptada às condições específicas de cada maternidade (Fig. 9).

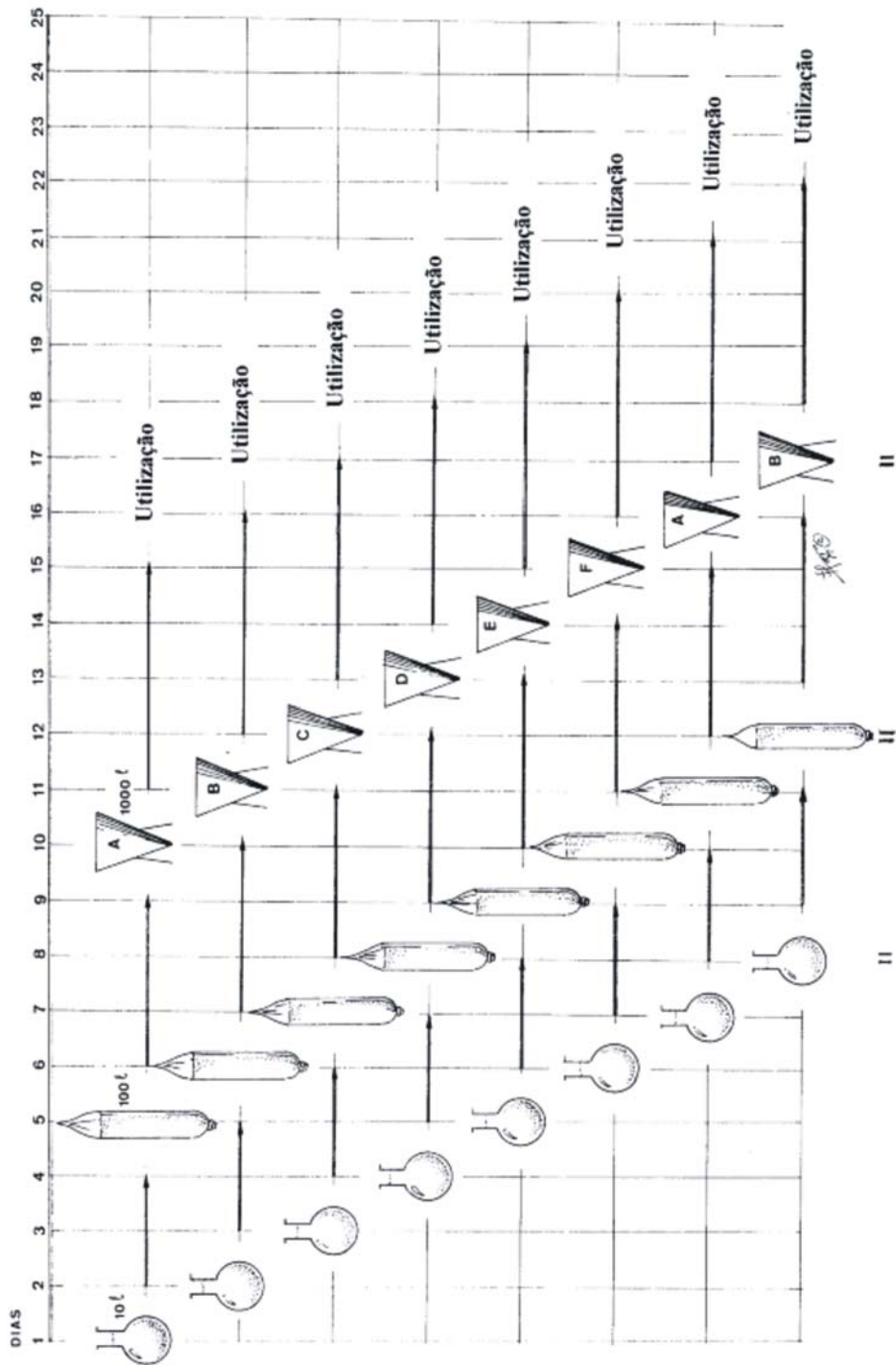


Figura 9 – Produção contínua de rotíferos em grandes volumes. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

## Metodologias em desenvolvimento

### - Controlo bacteriano

Um dos problemas do cultivo dos rotíferos é a grande quantidade de bactérias (ex: *Vibrio* spp.) que se desenvolvem nos tanques, afectando a produção de rotíferos, e que ao serem transferidas com estes para os tanques larvares podem vir a causar mortalidades significativas nos peixes (Gomez-Gil *et al.*, 2003). Vários são os métodos que se utilizam para controlar e diminuir estas bactérias, nomeadamente com a gestão do alimento a fornecer, a lavagem dos rotíferos após colheita, a utilização de peróxido de oxigénio (vulgo água oxigenada), de produtos à base de iodo e de variados antibióticos, com resultados mais ou menos satisfatórios. (Abu-Rezq *et al.*, 2002; Martínez-Díaz *et al.*, 2003). Existem no mercado alguns produtos comerciais para enriquecimento de rotíferos que são apresentados como tendo acção bacteriostática (ex: Bactosafe<sup>3</sup>).

A utilização de probióticos, (bactérias seleccionadas e leveduras) vem cada vez mais sendo considerada como uma alternativa, à utilização de antibióticos no controlo de bactérias patogénicas, que são transmitidas via cadeia alimentar para as larvas ou que se desenvolvem nos tanques larvares (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006).

Por exemplo, no sentido de controlar o desenvolvimento de bactérias que vão afectar os cultivos de rotíferos e que podem ser patogénicas para as larvas, utilizam-se como probióticos - bactérias consideradas benéficas e que produzem ácido láctico (LAB – “lactic acid bactéria”) como *Lactococcus casei ssp. casei*, *Pediococcus acidilactici* ou *Lactobacillus lactis spp lactis*. (Planas *et al.*, 2004).

A definição de probiótico, a escolha da bactéria ou levedura a utilizar para este efeito assim como a sua utilização quer na produção da cadeia alimentar quer nos tanques de cultivo larvar e as suas implicações no sucesso das produções poderá ser consultada no trabalho de revisão sobre o tema de Vine *et al.*, (2006).

---

<sup>3</sup> Bactosafe® BernAqua, Olen, Belgium.

#### - Ovos de resistência

Com vista a um maior controlo da produção, começam a ser produzidos ovos de resistência de *B. plicatilis* e a estar disponíveis no mercado, que poderão ser utilizados para iniciar novos cultivos (Balompapung *et al.*, 1997a; Hamada *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993; Hirayama & Hagiwara, 1995; Lubzens & Zmora, 2003). Estes ovos são previamente lavados (desinfectados) com hipoclorito de sódio (1 ppm) durante 1 hora o que elimina bactérias e aumenta a taxa de eclosão (Balompapung *et al.*, 1997b).

Com o objectivo de obter uma maior produção de ovos de resistência foram efectuados ensaios com *B. rotundiformis*. Estes consistiram na produção dos rotíferos a 30 °C de temperatura, a 15~17 de salinidade e com uma densidade inicial de 1 rot.mL<sup>-1</sup>, seguida de uma diminuição da temperatura para 25 °C na fase exponencial de crescimento do cultivo, ao fim de 4 dias. Este método permitiu aumentar em 1,8 vezes o número de ovos produzidos em relação ao cultivo de controlo a 30 °C (Assavaaree *et al.*, 2003).

A utilização destes ovos poderá vir constituir uma alternativa para a obtenção de rotíferos sem estar dependente da sua produção diária.

#### - Produção em grandes densidades

Actualmente, ainda que de forma experimental ou à escala piloto, começam a utilizar-se sofisticados sistemas, com recurso a recirculação e tratamento da água, incluindo espumadores (“protein skimmer”) e utilização de ozono, para a produção de rotíferos em grandes densidades (> 5.000 rot mL<sup>-1</sup>). Vários são os sistemas e metodologias empregues nestes tipo de cultivo com vista a manter a qualidade da água (Dhert *et al.*, 2001; Suantika *et al.*, 2003).

Sistemas experimentais, com filtração de água do tanque de cultivo, através de membranas (0,4 µm de porosidade), e com adição em contínuo de água e microalga permitiram obter produções de 1,6x10<sup>5</sup> rot.mL<sup>-1</sup> (*B. rotundiformis*) em 4 dias (Yoshimura *et al.*, 2003).

## Bioencapsulação

Como foi referido a cultura dos rotíferos faz-se, muitas vezes, utilizando como alimento a levedura de padeiro, e esta é pobre do ponto de vista nutritivo, particularmente em ácidos gordos polinsaturados da cadeia n-3, indispensáveis ao desenvolvimento das primeiras fases larvares de muitos peixes marinhos. As carências dos referidos componentes da dieta são responsáveis pelas elevadas taxas de mortalidade e de malformações nas larvas dos peixes marinhos (Robin *et al.*, 1984; Kitajima, 1986; Watanabe *et al.*, 1979).

Torna-se, portanto, necessário o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo secundário (bioencapsulação) que permitem ultrapassar estas deficiências, através da enriquecimento dos rotíferos com produtos de elevado teor em compostos considerados essenciais, durante um período geralmente inferior a 24h e imediatamente antes de serem fornecidos como alimento para as larvas. Os rotíferos apresentam um nível de PUFA *n*-3 proporcional ao das dietas enriquecedoras e também ao tempo de cultivo secundário (enriquecimento específico num determinado produto), embora esta relação seja mais variável (Abu-Rezq *et al.*, 2002; Castell *et al.*, 2003; Fernandez-Reiriz & Labarta, 1996; Navarro *et al.*, 2001; Pousão-Ferreira *et al.*, 1996; Pousão-Ferreira *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1996). Deste modo, parece ser de extrema importância quer a composição do produto utilizado quer a duração (tempo) do enriquecimento.

Em relação ao conteúdo em proteína e à composição em aminoácidos, também se verifica dependência em relação à composição do alimento, encontrando-se diferenças significativas, em relação ao perfil em aminoácidos, entre rotíferos alimentados com diferentes dietas (Aragão *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2006).

De acordo com a concentração do tanque de cultivo e com as necessidades para o dia, retira-se o volume que contem os rotíferos de que necessitamos do seguinte modo:

- Por sifonagem, através de um filtro de 55 µm ou 80 µm, de acordo com a estirpe que estamos a utilizar, retira-se o volume um pouco superior ao número de

rotíferos necessários, para compensar eventuais perdas, (nos processos de filtração e lavagem);

- Dentro do filtro são abundantemente lavados com água salgada à mesma temperatura do tanque de cultivo, para retirar os restos de levedura, microalgas, bactérias e metabólitos;

- Após a lavagem são concentrados e colocados noutra tanque onde se procede ao seu enriquecimento nutritivo, utilizando uma microalga (ou mistura de várias), produtos comerciais ou emulsões laboratoriais preparados para o efeito. Estas utilizam normalmente gema de ovo, lecitina de ovo ou de soja, como emulsionante de óleos, permitindo a sua solubilidade na água.

As microalgas, utilizadas para tentar corrigir as deficiências nutricionais dos rotíferos alimentados com levedura, têm sido progressivamente substituídas por dietas artificiais (emulsões e microcápsulas). Estas têm a vantagem de ser simples, estabelecer e manter constante a sua composição química, nomeadamente no caso dos ácidos gordos, controlar os níveis de PUFA (n-3) ou a relação entre os totais da série linolénica e linoléica ( $\sum n-3 / \sum n-6$ ) e DHA/EPA. A utilização de alimentos (emulsionados) formulados artificialmente, de baixo custo e com composições adequadas, pode constituir a solução ideal para o cultivo de rotíferos. No entanto, é necessário ter em conta a estabilidade do alimento do ponto de vista físico (ex: permanência na coluna de água) e químico (ex: oxidação dos lípidos) (McEvoy *et al.*, 1995).

O tempo necessário para este processo depende do produto utilizado, sendo normalmente para as microalgas de 12 a 18 horas, a uma concentração de 1000 a 2000 rot.mL<sup>-1</sup>. As microalgas a utilizar deverão encontrar-se na fase estacionária de modo a possuírem o conteúdo máximo em ácidos gordos. Os produtos comerciais são acompanhados de instruções de utilização, variando o tempo de enriquecimento entre 4 a 6 horas e as concentrações entre 400 e 1000 rot.mL<sup>-1</sup>. A bioencapsulação com alimentos inertes de difícil suspensão ou com tempos de enriquecimento que implicam a sua utilização fora das horas normais de trabalho (ex: 4 horas de enriquecimento para utilizar às 8 horas da manhã) pode ser melhorado através da sua distribuição contínua ou automática com equipamentos apropriados. Porém a



necessidade de manter concentrações mínimas e, nalguns casos, de os manter refrigerados, eleva os custos de tal opção.

A bioencapsulação permite aos rotíferos incorporarem as características nutritivas das algas, incluindo vitaminas (Souto *et al.*, 2005) ou produtos fornecidos e servirem de veículo transportador, destes elementos ou outros como antibióticos, para as larvas. Após a bioencapsulação são retirados do modo descrito anteriormente e abundantemente lavados para retirar os produtos do metabolismo, bactérias que se desenvolvem nos tanques e restos de gordura. É fundamental evitar que os lípidos dos produtos de bioencapsulação sejam introduzidos nos tanques de cultivos larvares. Estes vão formar uma película gordurosa à superfície da água, aumentando a tensão superficial, o que pode impedir as larvas de capturarem ar atmosférico e insuflarem a bexiga gasosa.

### Tanques e equipamentos

Os tanques utilizados para a produção são de forma cilíndrico-cônica com um volume entre 1-2 m<sup>3</sup> (Figs. 10 e 11), podendo ser bastante maiores em maternidades de grandes dimensões. Os tanques utilizados para a bioencapsulação são idênticos, podendo ser de menores volumes (250-500 L). Esta forma de tanques permite



Figuras 10 e 11 – Tanques de cultivo de rotíferos.

manter a cultura em suspensão utilizando o arejamento de fundo. A sua limpeza é também facilitada, sendo possível executar purgas regulares.

Como equipamento específico são utilizados filtros com redes de nylon (rede para plâncton) entre 55 $\mu$ m e 80 $\mu$ m, para colheita e lavagem dos rotíferos.

A água salgada de abastecimento a esta zona deve ser filtrada por bateria de filtros de cartucho (“cartridge”) em série com porosidades decrescentes entre 50 $\mu$ m e 1 $\mu$ m. O número de filtros da bateria, assim com o tamanho de poro intermédio a utilizar, dependem da matéria em suspensão da água captada na unidade. Após a filtração deverá utilizar-se um aparelho com lâmpadas de ultravioletas, com capacidade para volume de água a utilizar, para eliminar bactérias e outros microrganismos. Para aumentar o débito de água, que é substancialmente diminuído pela filtração através dos cartuchos, intercala-se uma electrobomba antes da bateria de filtros.

A manutenção da temperatura dos cultivos é feita através do aquecimento da sala, normalmente utilizando irradiadores de calor do circuito proveniente da caldeira de aquecimento de água salgada. Poderão ser utilizados irradiadores eléctricos a óleo ou resistências com termóstato directamente nos tanques. No entanto, esta última solução é de evitar por ser pouco prática, obrigando a uma atenção redobrada quando se aumenta ou diminui o volume dos tanques de forma a não submergir ou emergir demasiado as resistências e termóstato. Existe também o perigo de electrocussão do operador em caso de quebra do equipamento ou deficiente funcionamento.

As salas de produção de rotíferos são normalmente iluminadas com luz natural sem a exposição directa dos tanques à luz solar de modo a evitar o crescimento de algas, que não sendo consumidas pelos rotíferos, podem contribuir para a poluição do meio e dificultam as tarefas de filtração dos cultivos.

A água salgada a utilizar nestas salas deve ser previamente aquecida (25-30 °C), de modo a evitar choques térmicos nos cultivos quando se enchem tanques de produção ou bioencapsulação. A diminuição da temperatura tem como consequência a diminuição da velocidade de crescimento da população.

O aquecimento da água salgada, para uma temperatura de 19-20 °C, numa maternidade é usualmente feito por uma caldeira. Para as salas de cultivo de zooplâncton deverá existir um permutador independente, que eleve a temperatura

para 25-30 °C, dimensionado para o débito necessário e preparado para trabalhar apenas algumas horas por dia, visto o consumo não ser em contínuo.

A lavagem dos rotíferos bioencapsulados com água aquecida, antes do seu fornecimento aos tanques larvares, facilita a remoção da gordura proveniente dos produtos de enriquecimento.

Em todos os cultivos a assepsia é fundamental, pelo que todos os equipamentos e utensílios devem ser específicos para estes cultivos e estar devidamente marcados com tinta à prova de água. É aconselhável ter cores distintas para os diversos utensílios (copos, baldes, etc.) nos diferentes sectores: ex: branco para as algas, azul para os rotíferos, verde para a *Artemia spp.*, castanho para os peixes, etc., de modo a evitar a sua incorrecta utilização. Devem ser sempre lavados e desinfectados após a utilização e colocados em local apropriado.

## **Cultura e bioencapsulação de Rotíferos (*Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformis*)**

A técnica de cultivo de rotíferos (*B. plicatilis* e *B. rotundiformis*) por nós utilizada pode ser resumida da seguinte forma:

O cultivo é realizado em tanques de 500 L ou de 1000L, a partir de inóculos puros mantidos em laboratório. O tanque pode ser iniciado com 1/5 do volume final; este é composto pelo inóculo de rotíferos, água salgada, microalga e água doce para obter a salinidade desejada. Este volume vai sendo sucessivamente acrescentado de modo a obter o tanque com o volume final e com concentração elevada de rotíferos em cerca de 5 dias. Pode também ser iniciado com o volume total, composto da mesma forma mas com uma concentração maior de rotíferos de modo a se obter uma concentração elevada de rotíferos em 4 ou 5 dias. Esta cultura é alimentada com produtos comerciais à base de leveduras ou com levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) e microalgas (só neste caso, 10 a 20% do volume de cultivo e nos dois primeiros dias). No entanto, para a produção em grandes concentrações utilizam-se os produtos comerciais que ao serem nutritivamente mais adequados à produção desta espécie permitem crescimentos mais rápidos e maiores concentrações finais. Estes produtos têm algum conteúdo em ácidos gordos o que além de ser benéfico para a reprodução dos rotíferos constitui um pré-enriquecimento para as larvas do peixes marinhos.

As microalgas não se utilizam para a produção de rotíferos em grandes volumes porque isso implicava um elevado consumo destas e filtrações sucessivas do tanque para diminuir o seu volume e voltar a fornecer microalga. Só são eventualmente utilizadas quando são fornecidas sobre a forma de concentrados (pasta de microalga).

A levedura de padeiro é fornecida várias vezes ao dia (3 a 5) de modo a ser consumida e não deteriorar a qualidade da água. Os produtos comerciais são fornecidos de acordo com as indicações dos fabricantes.

A salinidade deve estar no caso da levedura de padeiro a 20 e no caso dos produtos comerciais entre 20 e 30. A temperatura entre 26-28 °C, oxigénio dissolvido deve estar próximo da saturação e ser regularmente controlado, principalmente

quando se atingem grandes concentrações de rotíferos. Neste caso, utiliza-se normalmente oxigénio puro para conseguir manter os níveis de concentração adequados e por ter a vantagem de provocar menor turbulência no tanque o que evita a perda de ovos pelos rotíferos favorecendo o crescimento da população.

Esta cultura está pronta ao fim de 4-7 dias podendo ser utilizada sem reposição em 1 ou 2 dias ou com reposição enquanto houver crescimento. A verificação do número de fêmeas com ovos é fundamental na gestão da produção. De forma a evitar quebras na produção são sucessivamente iniciados novos tanques. Populações sem ovos não deverão ser utilizadas nem mesmo para bioencapsular para o dia seguinte porque normalmente têm uma grande quebra faltando rotíferos para fornecer às larvas.

Como o cultivo dos rotíferos, por questões de economia, utilizando como alimento a levedura de padeiro ou os referidos produtos comerciais, e nenhum deles satisfaz as exigências das larvas dos peixes marinhos, principalmente em ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa - HUFA (20:5n-3 e 22:6n-3), é necessário proceder à sua bioencapsulação, antes da sua utilização como alimento para as larvas. Estes ou são bioencapsulados no tanque de cultivo, quando a quantidade necessária o justifica ou são filtrados do tanque do cultivo, de acordo com as necessidades, lavados e concentrados. São colocados noutra tanque, normalmente de menor volume, onde se procede ao seu enriquecimento nutricional, utilizando-se microalgas (uma ou mistura de várias), emulsões preparadas em laboratório ou produtos comerciais ricos em lípidos (principalmente HUFA). O tempo necessário para este processo depende do produto utilizado, sendo normalmente para as microalgas de 12 a 18 horas, a uma concentração de 1000 a 2000 rotíferos.mL<sup>-1</sup>. Os produtos comerciais são acompanhados de instruções de utilização, mas normalmente as concentrações são menores (500 rot.mL<sup>-1</sup>) e o tempo mínimo de bioencapsulação recomendado entre 4 a 6 horas. Quando se procede ao enriquecimento nos tanques de cultivo os produtos utilizados nas últimas “refeições” são substituídos pelos produtos de bioencapsulação.

O conhecimento das necessidades nutricionais das larvas de peixes marinhos, como se referiu, tem evoluído muito nos últimos anos, nomeadamente no que se refere à dourada e robalo e principalmente em relação às necessidades em HUFA e

à sua relação com o crescimento e a sobrevivência. Os produtos comerciais para enriquecimento (bioencapsulação) de rotíferos para estas espécies têm vindo a reflectir estes conhecimentos aparecendo todos anos novos produtos ou novas versões dos existentes. No entanto, este tema encontra-se longe de estar esgotado e com a diversificação da produção com a introdução de novas espécies, cujas necessidades nutricionais ou ainda não são conhecidas ou o são apenas parcialmente, existe a necessidade urgente de continuar este tipo de estudos. Nos ensaios ou nas produções em pequena escala que se fazem com novas espécies é utilizada a mesma metodologia e os mesmos produtos de bioencapsulação que se utilizam para dourada e robalo, por serem o únicos disponíveis no mercado e não por se ter verificado serem os mais adequados.

Com o intuito de obter informação sobre a qualidade nutritiva dos rotíferos bioencapsulados quer em função do produto utilizado quer sobre as doses e o período de tempo necessários foram feitos vários ensaios utilizando microalgas, produtos comerciais e emulsionados preparados em laboratório. A utilização de determinado produto prende-se não só com o valor nutritivo final mas também com a gestão da própria unidade de produção. Por questões técnicas muitas vezes as concentrações de rotíferos a enriquecer têm de ser mais baixas que as indicadas, os horários de trabalho não são compatíveis com o enriquecimento por períodos de 4 a 6 horas. Neste último caso, por exemplo, em maternidades de pequenas dimensões nem sempre é viável a compatibilização de horários de trabalho com estas tarefas. Isto implica, por exemplo, que os rotíferos a enriquecer sejam filtrados antes das 18h e que o produto de enriquecimento seja fornecido, sem qualquer outra verificação, pelo guarda da noite às 2 h ou 4 h da madrugada, ou por equipamentos de distribuição automática, para serem utilizados às 8h na alimentação das larvas. Mesmos nos casos em que se enriquece todo o tanque de cultivo esta tarefa é feita sem a necessária verificação do estado da cultura pelo guarda da noite, quando existe tal personagem,

O fornecimento deste tipo de presas é feito de acordo com a densidade larvar e a experiência pessoal do operador, com vista a manter densidades no tanque de cultivo larvar entre 5 e 15 rot.mL<sup>-1</sup>. Normalmente o fornecimento é feito duas vezes ao dia, ao início da manhã e ao início da tarde, e reforçado quando necessário. No

entanto, a quantidade a fornecer está mais directamente relacionada com a disponibilidade de rotíferos nas proximidades das larvas, que nos primeiros dias de vida apenas se deslocam em pequenos percursos e ainda não têm uma visão apurada, que pelo consumo individual das larvas. Por outras palavras, são fornecidos em excesso para facilitar o seu encontro por parte das larvas. Isto leva a que, mesmo nos casos em que se trabalha com filtros nos tanques que permitem a saída em continuo dos rotíferos, devido à pouca adução de água aos tanques e às fracas correntes que se pretendem dentro destes (para não arrastar as larvas e as presas) que parte significativa dos rotíferos vão permanecer várias horas dentro dos tanques podendo perder o seu valor nutritivo.

Pelos motivos expostos e também para obter informação a utilizar em novas espécies, foram realizados vários enriquecimentos (bioencapsulações) e *desenriquecimentos* (inanição ou jejum), utilizando produtos comerciais, emulsionados feitos em laboratório e microalgas, em diferentes períodos de tempo. Os ensaios de *desenriquecimento* foram efectuados para comparar o valor nutritivo após o enriquecimento, quando são fornecidos às larvas, e o valor nutritivo quando são previsivelmente consumidos.

De cada uma destas culturas retiraram-se duas amostras com cerca de 1g, que se conservaram em azoto líquido para determinação do seu perfil em ácidos gordos.

## **Casos estudados**

Como foi referido, os ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA) são essenciais para as larvas de peixes marinhos nomeadamente a dourada e outros esparídeos. Com o objectivo de avaliar o valor nutricional - perfil em ácidos gordos - com vista ao enriquecimento de rotíferos procedeu-se à análise de alguns produtos comerciais para bioencapsulação de rotíferos, óleos comerciais e emulsões preparadas em laboratório com óleos comerciais. Os resultados são apresentados na Tabela II em que também se inclui o perfil dos ovos e larvas de dourada recém-eclodidas, com o intuito de comparar o seu perfil em ácidos gordos com os vários produtos. Se assumirmos que um ovo ou o saco vitelino de uma larva têm o perfil

ideal para o seu normal desenvolvimento este será a base de partida para o estudo das necessidades nutricionais das larvas de uma espécie. Neste sentido, tem-se vindo a tentar enriquecer as presas (rotíferos e *Artemia* spp.) utilizando produtos que obtenham resultados o mais aproximados dessas necessidades no que se refere a ácidos gordos. Conhecendo o perfil dos vários produtos (Tabela II) avaliámos a sua utilização no enriquecimento de rotíferos, qual o perfil final que se obtém (Tabela III) e qual o período de tempo necessário para enriquecer. Avaliámos também qual o tempo de permanência de determinado perfil nutritivo nos rotíferos sem se alimentarem.



- Perfil em ácidos gordos de alguns produtos utilizados na bioencapsulação de rotíferos, de ovos de dourada e de larvas recém- eclodidas.

Como se referiu, a obtenção de um perfil em ácidos gordos dos rotíferos que satisfaça as necessidades das larvas de peixes marinhos é um aspecto de primordial importância. Ao longo dos últimos anos, têm sido testadas variadas fontes de lípidos com este objectivo, pelo que se analisaram vários produtos, onde se incluem microalgas, emulsionados com vários tipos de óleos (de origem animal e vegetal) e emulsionados comerciais. Esta análise permitiu verificar por um lado o perfil nos principais ácidos gordos e grupos de ácidos gordos dos vários produtos e por outro o resultado da sua aplicação no enriquecimento de rotíferos, através da análise do perfil deste com diferentes tempos de enriquecimento.

A análise dos vários produtos permite verificar que diferem muito entre eles e dos ovos e larvas recém-eclodidas tomados como referência. Verifica-se que os produtos de origem vegetal (óleos e microalgas) como seria de esperar apresentam um perfil mais baixo em EPA e em DHA ou nalguns casos não possuem estes ácidos gordos. O mesmo se verifica nos rotíferos enriquecidos nos mesmos produtos, que reflectem o perfil do produto utilizado na sua bioencapsulação (Tabela II).

Com vista a obter o máximo de informação no sentido de preparar presas o mais adequadas às necessidades das larvas de dourada, tendo em conta não só o seu comportamento alimentar nesta fase mas também as várias limitações que podem aparecer na utilização prática dos protocolos de enriquecimento, fizeram-se vários ensaios no sentido de contribuir para a padronização de protocolos de bioencapsulação de rotíferos para larvas de dourada e outros esparídeos.

Tabela II - Perfil de diferentes produtos nos principais ácidos gordos necessários para as larvas de peixes marinhos.

Valores referentes a dois replicados. Na Tabela não se apresenta o desvio padrão (que não mostrou valores superiores a 10% de coeficiente de variação) por facilidade de leitura.

A.G. (µg/mg p.s.)	18:2n-6	18:3n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3	PUFA	HUFA	n-3/n-6	DHA/EPA	FAME
Levedura padeiro	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	2,0	0,0	3,1
Culture Selco	6,6	1,4	1,1	12,9	8,5	28,7	25,7	3,3	0,7	97,6
Selco™	27,8	7,1	5,2	73,8	49,8	193,1	153,0	4,3	0,7	541,7
Protein Selco™	12,1	2,7	2,4	28,1	29,9	86,0	72,9	4,3	1,1	208,5
Dry Selco™	11,3	2,8	4,6	53,5	53,5	140,7	128,7	6,6	1,0	265,2
Micro Feast™	13,1	2,4	0,5	7,9	6,4	24,8	1,5	1,5	0,8	82,5
Super Rotifer™	5,2	7,1	3,8	28,4	54,2	118,4	97,3	8,0	1,9	250,1
Super Artemia™	8,7	3,2	3,2	24,0	32,2	88,0	70,4	4,9	1,3	261,3
Frippak™	16,4	2,4	0,9	15,1	9,4	38,3	29,7	1,8	0,6	128,8
Nutripack™	6,0	0,1	0,7	10,8	13,5	44,0	29,9	4,1	1,3	349,5
Algamac™	0,1	0,0	1,7	2,3	81,0	118,7	117,5	2,7	35,0	395,9
Algal Rotifer™	3,4	1,5	0,8	5,8	9,8	25,5	18,9	3,9	1,7	68,1
Rich™	33,7	7,7	1,3	34,6	29,4	135,2	66,5	2,6	0,9	358,4
Rotifeed™	4,0	0,5	0,3	1,0	1,8	4,8	4,1	0,9	1,8	25,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	6,3	5,5	0,3	1,8	0,1	16,8	3,5	1,8	0,0	51,2
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	6,5	10,9	0,3	2,6	0,2	25,6	5,0	2,5	0,1	69,6
<i>Isochrysis galbana</i>	11,4	3,4	0,6	0,8	10,8	43,2	16,3	1,9	14,4	130,1
<i>Isochrysis aff. galbana ("T.Iso")</i>	12,8	4,0	0,9	1,4	3,6	33,9	11,7	1,2	3,2	99,8
O.F.Bacalhau	15,5	10,2	3,2	62,0	79,6	207,0	165,1	8,2	1,3	900,7
O. Girassol	482,5	0,0	0,0	0,0	0,8	483,9	0,9	0,0	0,0	727,8
O. Amendoim	118,5	0,0	0,0	0,1	0,0	119,5	0,6	0,0	0,0	405,3
O. Lula	6,1	5,3	4,1	48,0	71,0	168,2	149,7	9,8	1,5	410,8
O. Linhaça	55,9	217,9	0,1	0,1	0,0	257,1	0,9	3,9	0,0	382,5
Emulsão K (O.F.B.)	52,5	4,7	4,3	10,9	18,5	107,2	43,0	0,8	1,7	346,3
Emulsão K (O.Lula)	30,9	0,4	3,3	15,2	22,9	84,0	47,2	1,3	1,5	250,5
Emulsão K (O Girassol)	482,5	0,0	0,0	0,0	0,8	483,7	0,9	0,0	0,0	727,8
Emulsão K	52,5	4,7	4,3	10,9	18,5	107,2	43,0	0,8	1,7	346,3
Oleo de amendoim + lecitina	118,5	0,3	0,0	0,1	0,0	119,4	0,6	0,0	0,0	405,3
Oleo de soja + lecitina	155,9	0,4	0,3	0,6	0,5	3,3	2,2	0,2	0,3	330,1
Nippai™ (micro-ração)	7,9	0,0	1,8	9,0	14,2	30,5	27,8	2,6	1,6	112,3
Ovos dourada	1,1	0,4	1,1	9,8	26,8	56,0	42,4	9,2	2,7	107,4

Tabela III - Perfil de rotíferos enriquecidos com diferentes produtos nos principais ácidos gordos necessários para as larvas de peixes marinhos.

(Valores referentes a dois replicados. Incluído o desvio padrão)

A.G. (µg/mg P.S.)	18:2n-6	18:3n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3	PUFA	HUFA	n-3/n-6	DHA/EPA	FAME
Larva <i>S.aurata</i>	2,65 ± 0,03	0,15 ± 0,09	1,72 ± 0,49	8,36 ± 2,38	29,08 ± 2,75	50,57 ± 2,01	43,91 ± 2,44	9,29 ± 0,79	3,48 ± 0,32	121,12 ± 7,73
Ovos dourada	1,34 ± 0,26	0,36 ± 0,05	1,46 ± 0,27	13,92 ± 4,43	29,66 ± 3,32	61,08 ± 10,89	50,41 ± 9,20	15,65 ± 0,53	2,20 ± 0,46	124,03 ± 19,27
Rot. levedura	1,59 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,42 ± 0,45	1,20 ± 1,56	0,00 ± 0,00	5,18 ± 3,20	2,73 ± 2,74	0,84 ± 0,59	0,00 ± 0,00	30,44 ± 1,54
Rot. Fripack	10,00 ± 1,36	1,79 ± 0,49	1,00 ± 0,10	7,59 ± 1,34	4,43 ± 0,55	32,96 ± 4,77	17,65 ± 2,67	1,61 ± 0,06	0,59 ± 0,03	100,11 ± 10,88
Rot. MicroFeast	11,73 ± 0,51	2,68 ± 0,02	0,86 ± 0,02	2,45 ± 0,27	1,42 ± 0,25	26,30 ± 0,36	8,08 ± 0,62	0,73 ± 0,09	0,58 ± 0,04	81,73 ± 2,41
Rot. Selco	9,29 ± 2,30	2,07 ± 0,68	1,12 ± 0,23	9,29 ± 1,92	5,93 ± 1,12	40,51 ± 9,36	22,14 ± 4,13	2,10 ± 0,05	0,64 ± 0,01	123,56 ± 25,84
Rot. Protein Selco	8,54 ± 1,59	0,30 ± 0,06	1,70 ± 0,69	17,66 ± 3,65	18,25 ± 2,69	66,53 ± 2,30	45,97 ± 1,96	2,65 ± 0,19	1,03 ± 0,07	156,57 ± 7,36
Rot. DHA P. Selco	7,60 ± 0,82	1,23 ± 0,03	1,01 ± 0,05	5,45 ± 0,92	8,08 ± 1,08	30,53 ± 2,69	16,24 ± 2,02	2,18 ± 0,09	1,48 ± 0,08	97,51 ± 5,59
Rot. Dry Selco	6,63 ± 0,09	1,76 ± 0,01	2,06 ± 0,06	15,44 ± 2,81	14,32 ± 3,36	53,42 ± 7,57	39,19 ± 6,37	3,87 ± 0,53	0,77 ± 0,17	130,93 ± 6,88
Rot. Super Rotifer	2,45 ± 0,27	0,38 ± 0,11	3,57 ± 0,53	4,37 ± 0,29	11,84 ± 2,41	30,49 ± 4,74	29,29 ± 5,54	3,59 ± 0,63	2,70 ± 0,37	92,92 ± 15,00
Rot. Super Artemia	3,53 ± 0,57	0,25 ± 0,01	1,01 ± 0,20	2,38 ± 0,50	1,51 ± 0,18	14,15 ± 2,68	7,78 ± 1,69	1,07 ± 0,04	0,64 ± 0,06	107,78 ± 13,35
Rot. Algal (Trophic)	3,11 ± 0,02	0,93 ± 0,06	0,93 ± 0,05	2,88 ± 0,11	3,62 ± 0,11	16,11 ± 0,65	9,83 ± 0,13	2,01 ± 0,01	1,26 ± 0,01	67,81 ± 1,24
Rot. Algamac	0,64 ± 0,06	0,28 ± 0,05	5,70 ± 0,11	7,39 ± 0,44	104,59 ± 6,48	164,77 ± 6,46	162,30 ± 5,92	2,78 ± 0,13	14,21 ± 1,72	410,59 ± 19,68
Rot. Super Hufa	2,09 ± 0,18	0,97 ± 0,13	2,23 ± 0,57	20,98 ± 0,77	28,32 ± 2,05	61,32 ± 2,03	60,65 ± 1,69	8,87 ± 0,84	1,35 ± 0,15	127,36 ± 10,16
Rot. Rich	8,26 ± 1,51	1,00 ± 0,17	0,35 ± 0,06	4,51 ± 0,57	5,91 ± 0,53	23,90 ± 2,50	13,53 ± 0,69	1,49 ± 0,10	1,31 ± 0,05	85,26 ± 10,68
Rot. O.F.Bacalhau	14,47 ± 0,45	1,47 ± 0,14	2,64 ± 0,21	4,58 ± 0,35	4,17 ± 0,05	34,30 ± 1,55	14,32 ± 0,72	0,78 ± 0,01	0,91 ± 0,01	156,44 ± 2,80
Rot. O.Lula	11,44 ± 2,46	3,23 ± 0,74	2,54 ± 0,53	16,72 ± 4,09	23,60 ± 5,85	78,42 ± 18,27	50,59 ± 12,08	3,35 ± 0,12	1,41 ± 0,01	217,13 ± 49,67
Rot. O.Sardinha	3,34 ± 0,47	1,90 ± 0,03	0,70 ± 0,00	5,68 ± 0,18	6,56 ± 0,13	25,16 ± 0,04	15,58 ± 0,34	3,97 ± 0,50	1,15 ± 0,01	85,68 ± 0,11
Rot. O.Linhaça	16,41 ± 0,72	57,93 ± 2,72	0,45 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,21 ± 0,04	83,26 ± 3,46	6,88 ± 0,23	3,59 ± 0,01	0,28 ± 0,04	147,51 ± 4,79
Rot. O.Girassol	142,18 ± 21,52	3,11 ± 0,42	1,53 ± 0,31	1,17 ± 0,34	0,89 ± 0,02	154,88 ± 19,49	6,98 ± 1,51	0,05 ± 0,02	0,79 ± 0,25	304,46 ± 29,47
Rot. O.Soja	4,10 ± 1,04	0,23 ± 0,06	0,18 ± 0,08	0,58 ± 0,20	0,45 ± 0,21	7,37 ± 1,12	2,75 ± 0,41	0,47 ± 0,30	0,76 ± 0,11	42,94 ± 2,33
Rot. O. Amendoim	41,67 ± 0,62	3,47 ± 0,29	3,09 ± 0,11	1,60 ± 0,11	1,13 ± 1,13	15,40 ± 1,29	12,34 ± 0,98	0,22 ± 0,01	0,71 ± 0,01	210,89 ± 6,23
Rot. Nutripack	3,74 ± 0,09	1,51 ± 0,21	0,67 ± 0,02	5,06 ± 0,11	5,27 ± 0,06	23,56 ± 0,58	14,03 ± 0,31	3,02 ± 0,10	1,04 ± 0,01	93,57 ± 1,61
Rot. Nutrip+N. <i>oculata</i>	3,54 ± 0,40	2,02 ± 0,26	0,56 ± 0,28	2,10 ± 0,18	1,46 ± 0,23	13,79 ± 2,41	6,34 ± 1,50	1,50 ± 0,04	0,69 ± 0,05	65,48 ± 6,31
Rot. <i>T. suecica</i>	3,82 ± 0,30	6,93 ± 0,52	0,46 ± 0,09	2,67 ± 0,38	0,27 ± 0,03	27,24 ± 2,46	6,21 ± 0,99	4,47 ± 0,16	0,10 ± 0,00	68,26 ± 5,12
Rot. <i>N. gaditana</i>	4,67 ± 0,59	1,21 ± 0,28	0,95 ± 0,06	2,52 ± 0,24	0,66 ± 0,11	19,47 ± 1,56	7,54 ± 0,90	1,79 ± 0,14	0,26 ± 0,06	52,99 ± 5,62
Rot. <i>N. oculata</i>	3,95 ± 0,29	0,30 ± 0,04	1,34 ± 0,46	2,77 ± 0,13	0,19 ± 0,14	14,68 ± 1,06	7,17 ± 0,49	0,98 ± 0,21	0,06 ± 0,04	50,94 ± 4,79
Rot. <i>N. oculata</i> /Tiso	2,99 ± 0,19	1,27 ± 0,04	1,35 ± 0,05	2,52 ± 0,04	1,45 ± 0,23	16,89 ± 0,41	9,52 ± 0,46	1,69 ± 0,05	0,57 ± 0,08	56,74 ± 1,55
Rot. Ovos de dourada	1,25 ± 0,23	0,41 ± 0,08	0,88 ± 0,14	6,17 ± 0,80	13,80 ± 3,07	27,33 ± 5,02	24,96 ± 4,53	6,95 ± 0,12	2,22 ± 0,21	88,31 ± 17,80

## Bioencapsulação de rotíferos com microalgas

### - Bioencapsulação de rotíferos, em *Nannochloropsis oculata*, com duas densidades diferentes. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Foram efectuados ensaios de bioencapsulação de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) em *Nannochloropsis oculata*, com uma densidade de 750 rot.mL<sup>-1</sup> e outra de 1.500 rot.mL<sup>-1</sup> durante 24 h. Normalmente utiliza-se como padrão uma densidade de 1.000 rot.mL<sup>-1</sup> quando o enriquecimento é feito com microalgas pelo que neste caso utilizou-se uma densidade inferior e outra superior deste valor de modo a verificar se existia alguma influência da densidade de presas a enriquecer no seu perfil em ácidos gordos. Nas Figuras 12 e 13 apresenta-se o perfil nos principais ácidos gordos verificando-se que é bastante semelhante pelo que se poderá optar, com vantagem em termos de espaço e volume, pelo enriquecimento com maiores densidades, desde que se assegure a quantidade de microalga suficiente para alimentar os rotíferos. As microalgas utilizadas encontravam-se no início da fase estacionária com a correspondente concentração celular de acordo com a espécie utilizada (ver capítulo I).

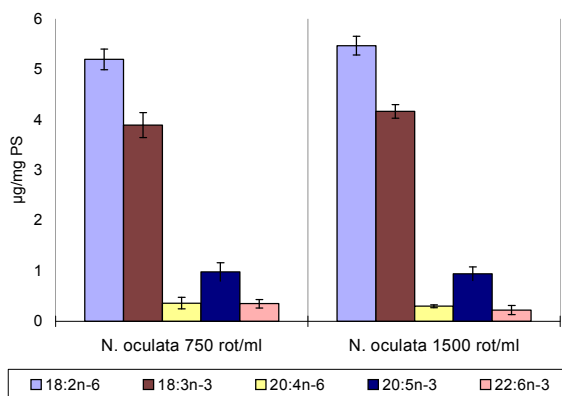


Figura 12 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Nannochloropsis oculata*.

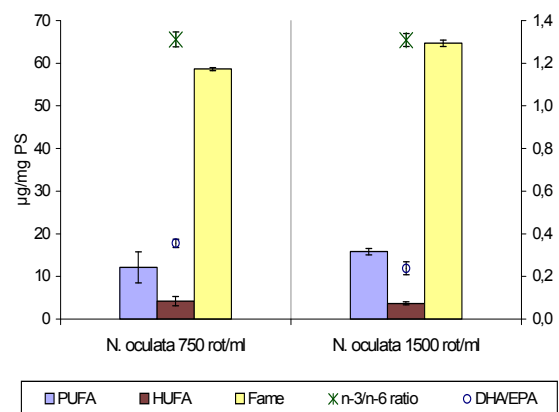


Figura 13 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Nannochloropsis oculata*.

O mesmo tipo de ensaio com duas densidades de rotíferos em enriquecimento (1.000 rot.mL<sup>-1</sup> e 2.000 rot.mL<sup>-1</sup>) foi efectuado com mistura a 50% de microalgas

(*Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso) durante 24 h. Aqui verifica-se um menor perfil em ácidos gordos essenciais para uma maior densidade de cultivo. Deste modo, os resultados em termos de perfil em ácidos gordos são favoráveis ao enriquecimento com 1.000 rot.mL<sup>-1</sup> (Figuras 14 e 15). Provavelmente, ainda que se tente manter microalgas disponíveis estas poderão não ter sido suficientes ou outro factor relacionado com a densidade ou os parâmetros físico-químicos do meio poderão afectar os resultados. Deste modo, e em face dos resultados dos ensaios apresentados, aconselha-se a utilização de densidades até 1500 rot.mL<sup>-1</sup>, por terem apresentado o melhor perfil em ácidos gordos.

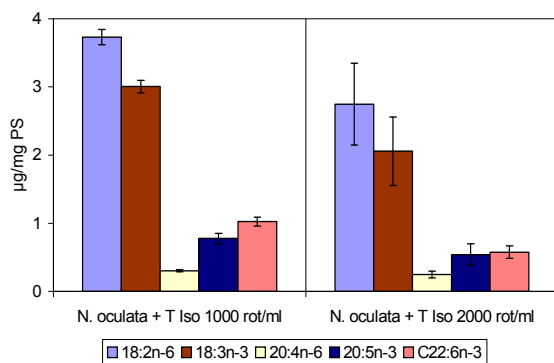


Figura 14 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

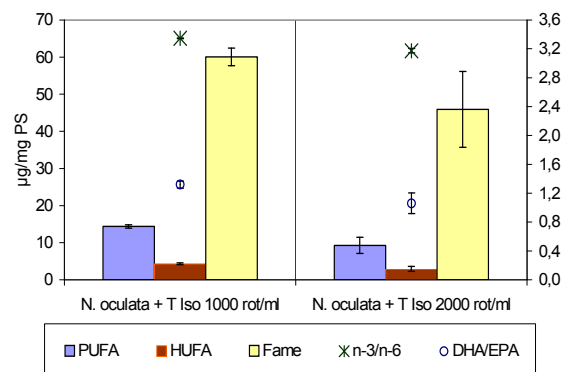


Figura 15 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso).

- Bioencapsulação de rotíferos, em *Tetraselmis suecica*, com duas densidades diferentes. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Na mesma sequência, ensaios semelhantes foram efectuados com outra microalga, de maiores dimensões e usualmente utilizada para manutenção de inóculos de rotíferos, como descrito anteriormente. Foram efectuados ensaios de bioencapsulação de rotíferos em *Tetraselmis suecica*, com uma densidade de 750 rot.mL<sup>-1</sup> e outra de 1.500 rot.mL<sup>-1</sup> durante 24h. Utilizou-se mais uma vez uma densidade inferior e outra superior da normal de bioencapsulação com microalgas (1000 rot.mL<sup>-1</sup>) de modo a verificar se existia alguma influência da densidade no perfil em ácidos gordos. Nas Figuras 16 e 17 apresenta-se o perfil nos principais ácidos gordos. Aqui, à semelhança dos resultados obtidos com *Nannochloropsis oculata* para a mesmas densidades, verifica-se que o perfil é bastante semelhante pelo que se poderá optar, com vantagem em termos de espaço e volume, pelo enriquecimento com maiores densidades, desde que se assegure a quantidade de microalga suficiente para alimentar os rotíferos.

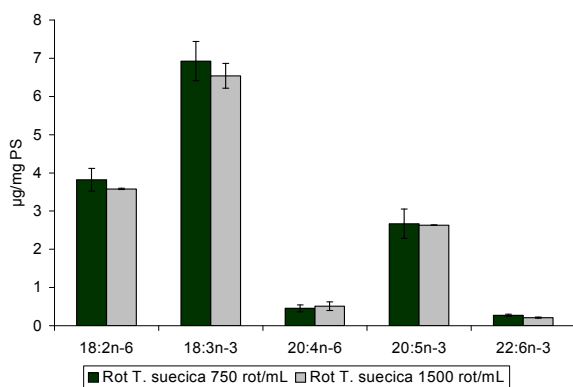


Figura 16 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Tetraselmis suecica*.

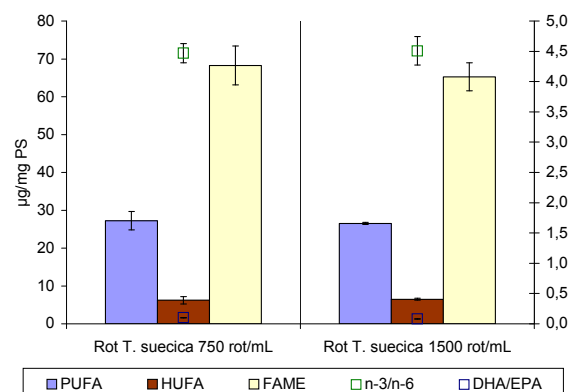


Figura 17 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos em duas diferentes densidades, enriquecidos com *Tetraselmis suecica*.

- Bioencapsulação de rotíferos, em *Nannochloropsis gaditana*, em quatro diferentes tempos de enriquecimento. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Com o objectivo de avaliar qual o tempo necessário para se obter o melhor perfil em ácidos gordos de rotíferos alimentados com a microalga *Nannochloropsis gaditana*, realizaram-se vários ensaios de enriquecimento, tendo como base os tempos recomendados para produtos comerciais utilizados com o mesmo objectivo. Deste modo, utilizaram-se 4 tempos diferentes de enriquecimento 3h, 6h, 8h e 12h com rotíferos anteriormente cultivados com levedura de padeiro, com uma densidade de  $1000 \text{ rot. mL}^{-1}$  e a uma temperatura de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Verifica-se, um aumento no perfil em ácidos gordos quer em relação ao perfil dos rotíferos cultivados em levedura de padeiro quer em relação aos diferentes tempo de enriquecimento (Figuras 18 e 19). Verifica-se que o perfil final aponta no sentido de os rotíferos necessitarem de períodos mais prolongados de enriquecimento com microalgas que os aconselhados para os produtos comerciais.

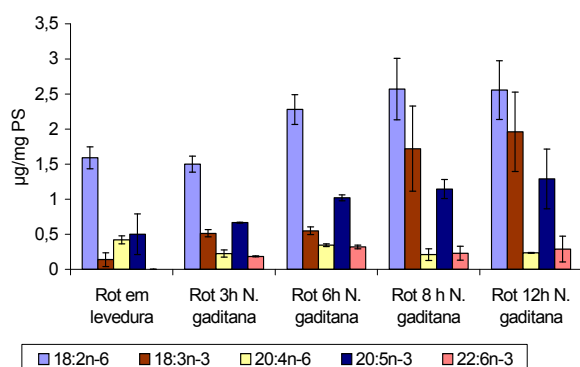


Figura 18 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com *Nannochloropsis gaditana* durante 3h, 6h, 8h e 12h.

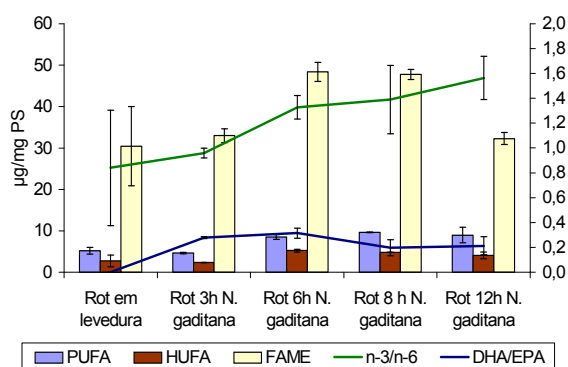


Figura 19 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com *Nannochloropsis gaditana* durante 3h, 6h, 8h e 12h.

- Bioencapsulação de rotíferos, em *Nannochloropsis gaditana*, em três diferentes tempos de enriquecimento. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Em face dos resultados anteriores fomos avaliar se, prolongando por mais tempo o tempo de enriquecimento de rotíferos com a microalga *Nannochloropsis gaditana*, a tendência par aumentar o perfil de ácidos gordos se mantinha. Foram assim realizados vários ensaios com três períodos de tempo mais prolongados (17h, 21h e 24h) de enriquecimento.

Verificou-se que para além de ser ter obtido um perfil em ácidos gordos bastante superior ao dos resultados anteriores também se verificaram diferenças entre estes tratamentos com o perfil a aumentar com o tempo de enriquecimento (Figuras 20 e 21).

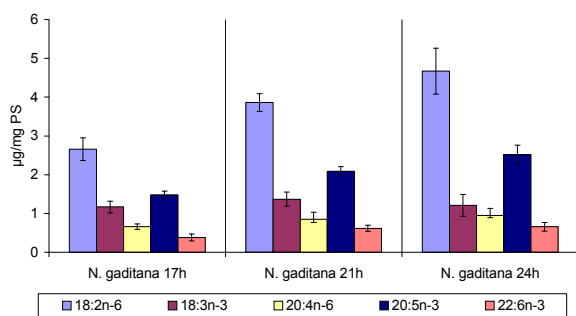


Figura 20 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com *Nannochloropsis gaditana* durante 17h, 21h e 24h.

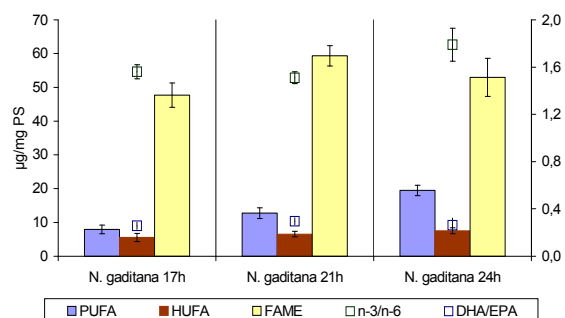


Figura 21 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com *Nannochloropsis gaditana* durante 17h, 21h e 24h.



- Bioencapsulação de rotíferos numa mistura de duas microalgas: *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso"). Efeito no perfil em ácidos gordos.

Conhecendo o perfil nutritivo em EPA e DHA de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso"), em que a primeira apresenta melhor perfil em EPA e a segunda em DHA, realizaram-se ensaios de enriquecimento durante 24 horas, de rotíferos com um mistura das duas microalgas, com o intuito de aumentar o perfil final em DHA que é quase nulo quando se enriquece apenas na primeira microalga. Foi utilizada uma mistura de 50%-50% e outra de 70%-30% respectivamente de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso").

Verifica-se o que o perfil em EPA e em DHA reflecte o perfil da mistura sendo mais elevado o EPA quando se utiliza mais *N. oculata* e mais elevado em DHA na mistura com maior percentagem de *I. aff. galbana* ("T. Iso"), (Figuras 22 e 23).

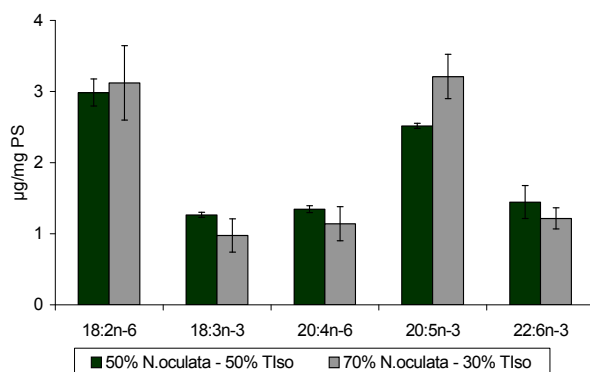


Figura 22 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com mistura (50%-50%) de *Nannochloropsis oculata* *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso").

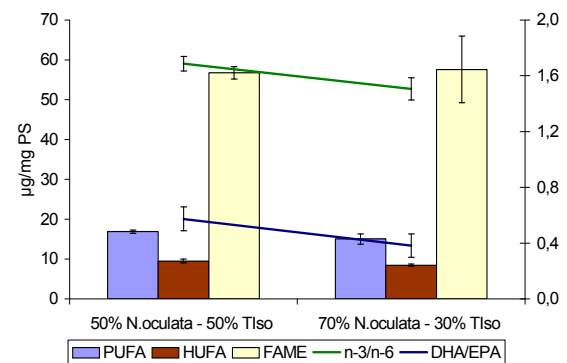


Figura 23 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com mistura (70%-30%) de *Nannochloropsis oculata* *Isochrysis aff. galbana* ("T.Iso").

- Bioencapsulação de rotíferos com *Nannochloropsis oculata* seguida de um período de inanição (*desenriquecimento*). Efeito no perfil em ácidos gordos.

No sentido de simular o que acontece nos tanques de cultivo larvar em que as presas vão sendo consumidas ao longo do tempo (e não logo após o seu enriquecimento), avaliámos se o perfil em ácidos gordos de rotíferos recém enriquecidos se manteria quando estes deixam de se alimentar por várias horas (inanição - *desenriquecimento*). Neste sentido realizaram-se ensaios de enriquecimento de rotíferos com a microalga *Nannochloropsis oculata* durante 18h. Após este período retirámos amostras para determinação do perfil em ácidos gordos e sujeitaram-se os rotíferos a um período de inanição (jejum) durante 6h, em água salgada filtrada e esterilizada por radiação ultra-violeta (U.V.), a 19°C de temperatura (situação semelhante à dos tanques de cultivo larvar). Ao fim deste período de tempo os rotíferos foram retirados e concentrados para análise. Verificou-se que o perfil em ácidos gordos, com especial ênfase para o EPA desce consideravelmente (Figuras 24 e 25). Estes resultados são importantes para uma correcta programação do fornecimento de rotíferos aos tanques larvares, quer em termos de quantidade quer de periodicidade ao longo do dia. Aconselhar-se-ia mesmo que os rotíferos não consumidos fossem sendo retirados dos tanques e substituídos por novos recém enriquecidos.

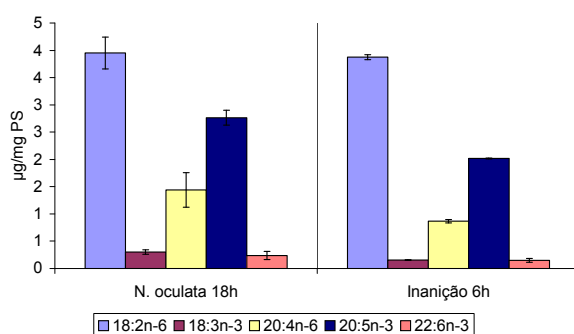


Figura 24 – Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos 18h com *Nannochloropsis oculata* e após 6h de inanição.

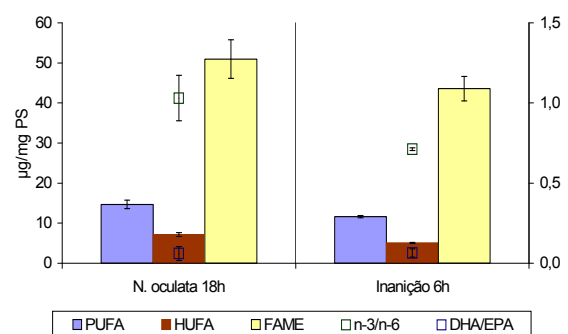


Figura 25 – Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de rotíferos enriquecidos 18h com *Nannochloropsis oculata* e após 6h de inanição.

## **Bioencapsulação de rotíferos com emulsões lipídicas e produtos comerciais**

Como se verificou que o perfil nutritivo dos rotíferos enriquecidos com microalgas fica muito aquém do perfil dos ovos e larvas, vários produtos e emulsões foram criadas com o objectivo de colmatar esta lacuna.

### - Bioencapsulação de rotíferos com emulsão lipídica, produtos comerciais e microalgas. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Efectuaram-se vários ensaios de enriquecimento de rotíferos com produtos comerciais, microalgas, uma emulsão com óleo de fígado de bacalhau e ovos frescos de dourada para avaliar o perfil em ácidos gordos dos rotíferos alimentados com estes produtos. O tempo de enriquecimento foi o recomendado pelos fabricantes nos produtos comerciais e de 18h para os restantes.

Esta avaliação permitiu definir um protocolo de utilização dos diferentes produtos em função da sua composição e assimilação pelos rotíferos e da sua retenção nestas presas. Como se pode observar nas Figuras 26, 27 e 28 e pela consulta das Tabelas II e III verifica-se que o perfil lipídico dos produtos utilizados na sua maioria difere substancialmente do conteúdo dos ovos e das larvas recém-eclodidas tomadas como referência, acontecendo o mesmo para o dos rotíferos enriquecidos.

Da análise da bioencapsulação dos rotíferos com diferentes produtos poderá concluir-se que os rotíferos cultivados em levedura não têm qualidade nutritiva nos principais ácidos gordos e grupos de ácidos gordos, para as larvas dos peixes marinhos sendo necessário proceder à sua bioencapsulação, antes de os fornecer às larvas. Dos restantes produtos utilizados verifica-se que as microalgas apresentam valores relativamente baixos para os mesmos ácidos gordos, variando a composição de acordo com a espécie utilizada. A mistura de diferentes espécies de microalgas pode melhorar o perfil, nomeadamente em DHA e EPA. A emulsão preparada em laboratório com óleo de fígado de bacalhau apresenta um perfil semelhante a alguns produtos comerciais, superior às microalgas mas inferior ao Protein Selco® e à bioencapsulação com ovos frescos de dourada (em DHA e *n-3/n-*

6). Com a bioencapsulação com ovos frescos de dourada conseguem-se os valores mais elevados de DHA, e a maior razão n-3/n-6 e razão DHA/EPA.

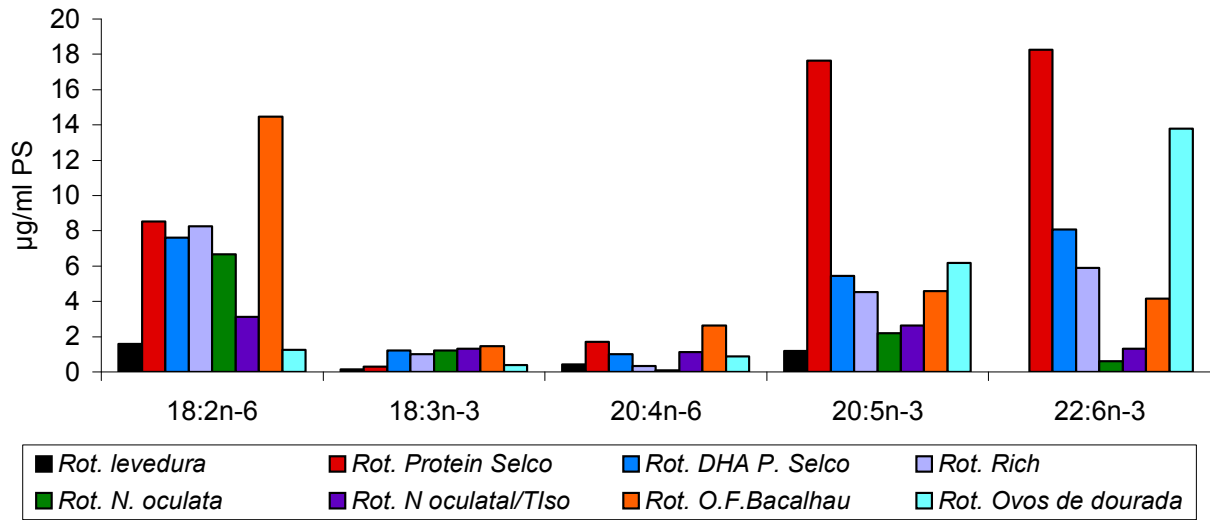


Figura 26 - Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos com diferentes produtos.

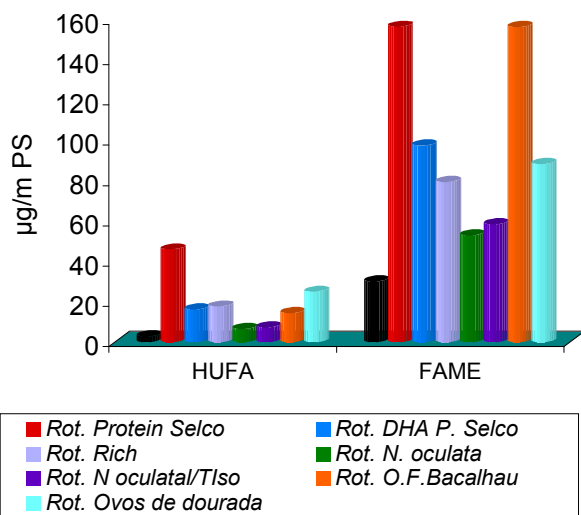


Figura 27 – Valores em HUFA e relação de n3/n6 de rotíferos enriquecidos com diferentes produtos.

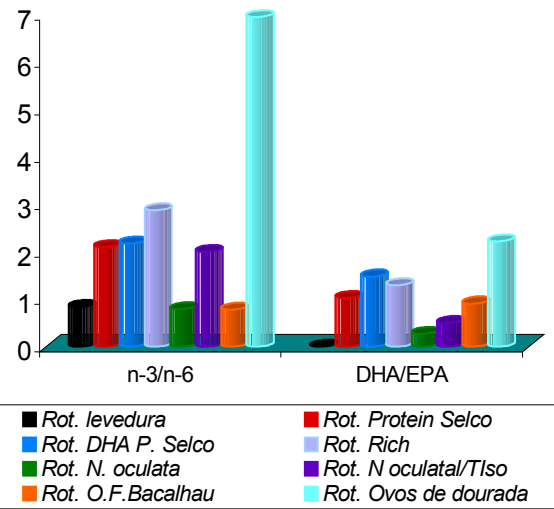


Figura 28 - Relação de DHA/EPA de rotíferos enriquecidos com diferentes produtos.

- Bioencapsulação de rotíferos com Protein Selco® em cinco diferentes tempos de enriquecimento. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Com o objectivo de avaliar qual o tempo necessário para se obter o melhor perfil em ácidos gordos de rotíferos alimentados com Protein Selco®, à semelhança do que fez com a microalga *Nannochloropsis gaditana*, realizaram-se vários ensaios de enriquecimento, tendo como base as doses e concentrações de rotíferos recomendadas para o produto. Deste modo, utilizaram-se 5 tempos diferentes de enriquecimento 4h, 6h, 8h, 18h e 24h com rotíferos anteriormente cultivados com levedura de padeiro. A distribuição do Protein Selco® foi feita manualmente não tendo sido utilizados dispositivos de distribuição automática. Foram fornecidas duas doses de Protein Selco®, a primeira no início do enriquecimento e a segunda após 12 horas.

Verifica-se um aumento no perfil em ácidos gordos quer em relação ao perfil dos rotíferos cultivados em levedura de padeiro quer em relação aos diferentes tempos de enriquecimento. Verifica-se que o perfil final aponta no sentido de os rotíferos necessitarem de períodos mais prolongados de enriquecimento que o aconselhado pelo fabricante (6-8h), com um máximo às 18h (Figuras 29 e 30). Nos rotíferos retirados após 8h enriquecimento observou-se uma quebra no perfil em ácidos gordos o que poderá estar relacionado com o alimento se ter esgotado. Este foi acrescentado e o perfil recuperou para o valor máximo obtido. Novamente se verifica uma quebra, mais acentuada, às 24h eventualmente pelos mesmos motivos e também por uma provável degradação da qualidade da água do meio.

Estes resultados apontam também para a necessidade de acerto nos horários de fornecimento do produto de enriquecimento, tendo em conta quer o seu consumo pelos rotíferos quer a sua oxidação (num meio a 26-28 °C e com bastante oxigénio).

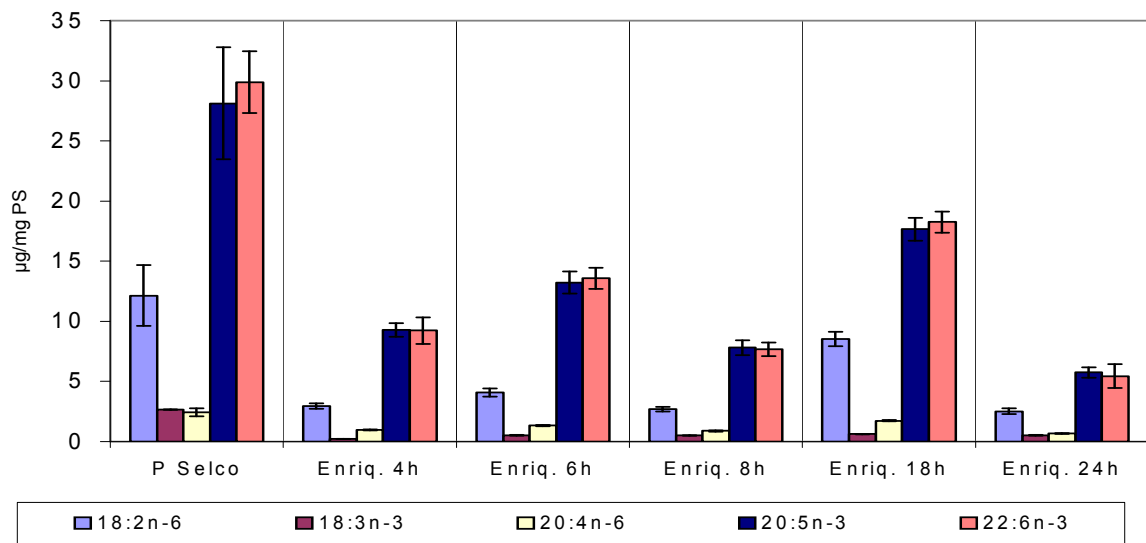


Figura 29 – Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de Protein Selco® e evolução do perfil em rotíferos enriquecidos durante diferentes horas com este produto.

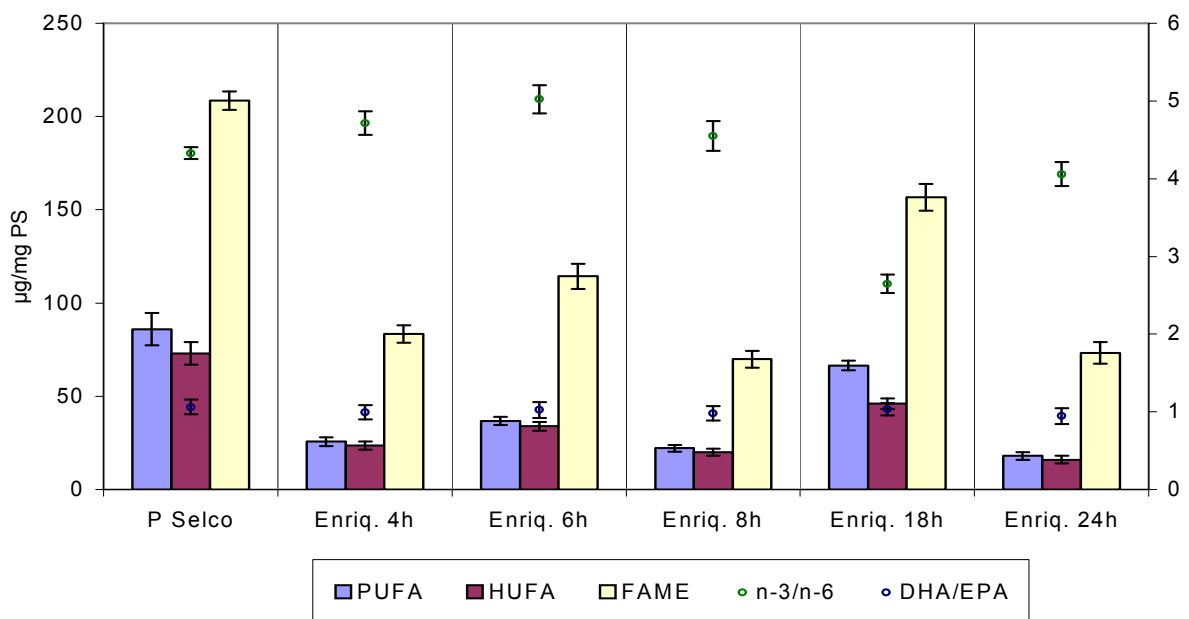


Figura 30 – Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de Protein Selco® e evolução do perfil em rotíferos enriquecidos durante diferentes horas com este produto.

- Bioencapsulação de rotíferos com Protein Selco<sup>®</sup> seguida de períodos de inanição (desenriquecimento). Efeito no perfil em ácidos gordos.

Os rotíferos são fornecidos aos tanques larvares em excesso, como foi referido, no sentido de facilitar a sua captura pelas larvas, permanecendo várias horas nos tanques. Tal como para o caso anterior com uma microalga, simulou-se o que acontece nos tanques de cultivo larvar, para verificar se o perfil em ácidos gordos de rotíferos recém-enriquecidos se manteria, mesmo utilizando um produto específico para enriquecimento, quando estes deixam de se alimentar por várias horas (*desenriquecimento*). Neste sentido realizaram-se ensaios de enriquecimento de rotíferos com o produto comercial Protein Selco<sup>®</sup> durante 18h. Após este período, retiraram-se amostras para determinação do perfil em ácidos gordos e sujeitaram-se os rotíferos a um período de inanição durante 3h, 6h e 24h. Estes últimos correspondem aos que se encontram nos tanques larvares no dia seguinte ao amanhecer, antes de se fornecer novo alimento, e que as larvas vão consumir. Esta simulação foi feita em água salgada filtrada e esterilizada por radiação ultra-violeta (U.V.), a 19 °C de temperatura (situação semelhante à dos tanques de cultivo larvar). Ao fim deste período de tempo os rotíferos foram retirados e concentrados para análise. Verificou-se que o perfil em ácidos gordos de um modo geral desce consideravelmente, ficando ao nível do perfil antes do enriquecimento (rotíferos alimentados com levedura), (Figuras 31 e 32). Nestas figuras podem-se também comparar os perfis em ácidos gordos do próprio produto (Protein Selco<sup>®</sup>) e de rotíferos alimentados com levedura de padeiro.

Estes resultados são importantes para uma correcta programação do fornecimento de rotíferos aos tanques larvares, quer em termos de quantidade quer de periodicidade ao longo do dia. Mostram também a importância de utilizar filtros que permitam a saída dos rotíferos, principalmente durante o período nocturno e para a necessidade de fornecer alimento às larvas às primeiras horas de luz do dia.

Estes ensaios, e os anteriores do mesmo tipo, apontam para a importância de fornecer presas diversas vezes por dia aos tanques larvares. Deverá evitar-se uma permanência demasiado longa dos rotíferos nos tanques, ao ponto do seu valor nutritivo ser muito deficiente, com as necessárias consequências negativas em

termos de crescimento, sobrevivência larvar e provavelmente nas malformações esqueléticas.

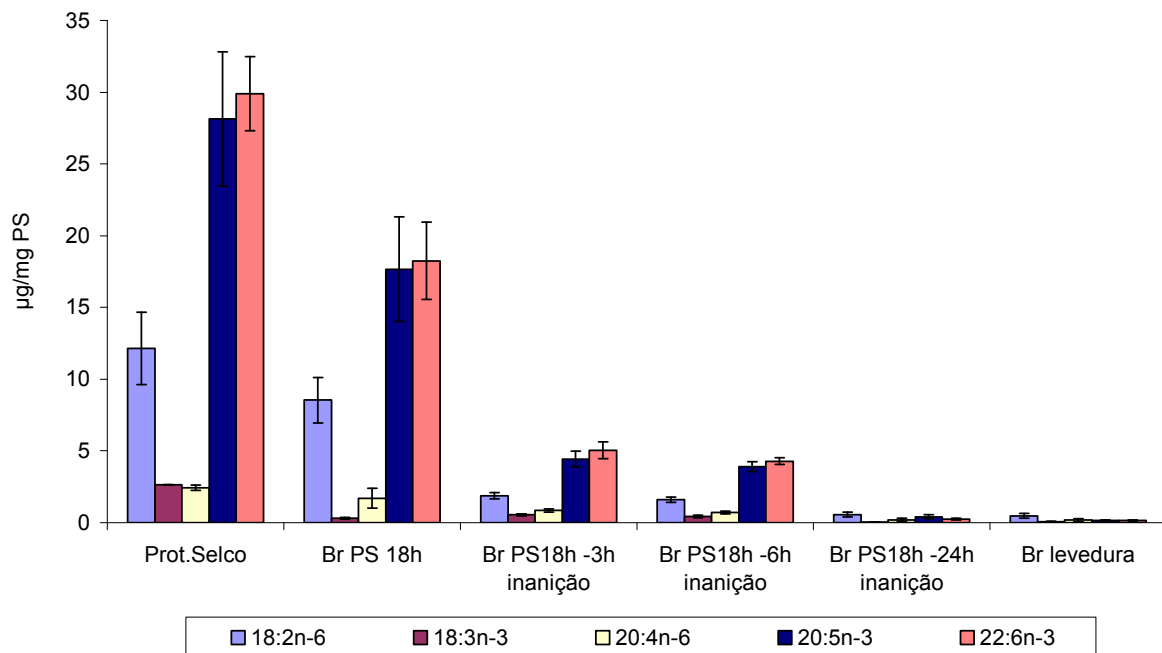


Figura 31 – Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos de Protein Selco®, rotíferos enriquecidos 18h com este produto, com levedura de padeiro e após algumas horas de inanição.

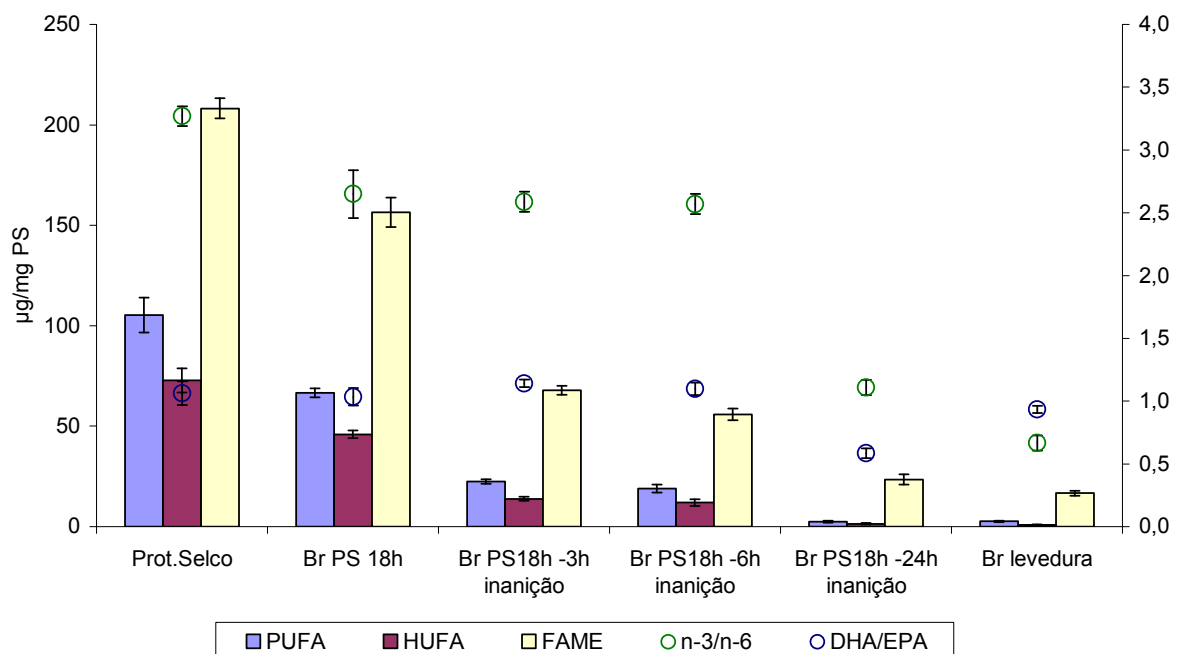


Figura 32 – Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, Protein Selco®, rotíferos enriquecidos 18h com este produto, com levedura de padeiro e após algumas horas de inanição.



- Efeito da introdução de microalgas, nos tanques de cultivo larvar, no perfil em ácidos gordos dos rotíferos.

No cultivo da dourada e outros esparídeos utiliza-se o que se designa por “água verde”, que consiste na adição e manutenção de cerca de  $150.000 \text{ cel.mL}^{-1}$  de microalgas nos tanques. Um dos objectivos desta metodologia é manter alimentadas as presas que permanecem nos tanques, tentando minimizar as perdas de valor nutritivo.

Deste modo, procedeu-se a ensaios em que se simularam as condições dos tanques de cultivo, nuns casos incluindo a manutenção de  $150.000 \text{ cel.mL}^{-1}$  de uma microalga (*Nannochloropsis gaditana*) e noutros condições semelhantes mas sem a microalga. O objectivo foi verificar se a microalga de algum modo contribuía para manter os rotíferos alimentados, evitando uma queda acentuada do seu perfil lipídico. Foi comparado o perfil em ácidos gordos dos rotíferos recém enriquecidos e ao fim de 3h e 6h de *desenriquecimento* (com e sem “água verde”), com vista a avaliar a vantagem da “água verde” no que diz respeito a este aspecto (Figuras 33 e 34).

Os resultados obtidos mostram que com o método da “água verde” o perfil em ácidos gordos do rotíferos, embora desça acentuadamente em relação aos recém enriquecidos com Protein Selco, permanece ligeiramente superior principalmente em relação ao EPA. Parece-nos deste modo, que este método apresenta vantagens no que diz respeito ao valor nutritivo das presas.

No entanto, parece-nos que pelos resultados obtidos, será melhor estratégia deixar sair do tanque os rotíferos não consumidos e ir acrescentando rotíferos recém bioencapsulados, com melhor perfil em ácidos gordos.

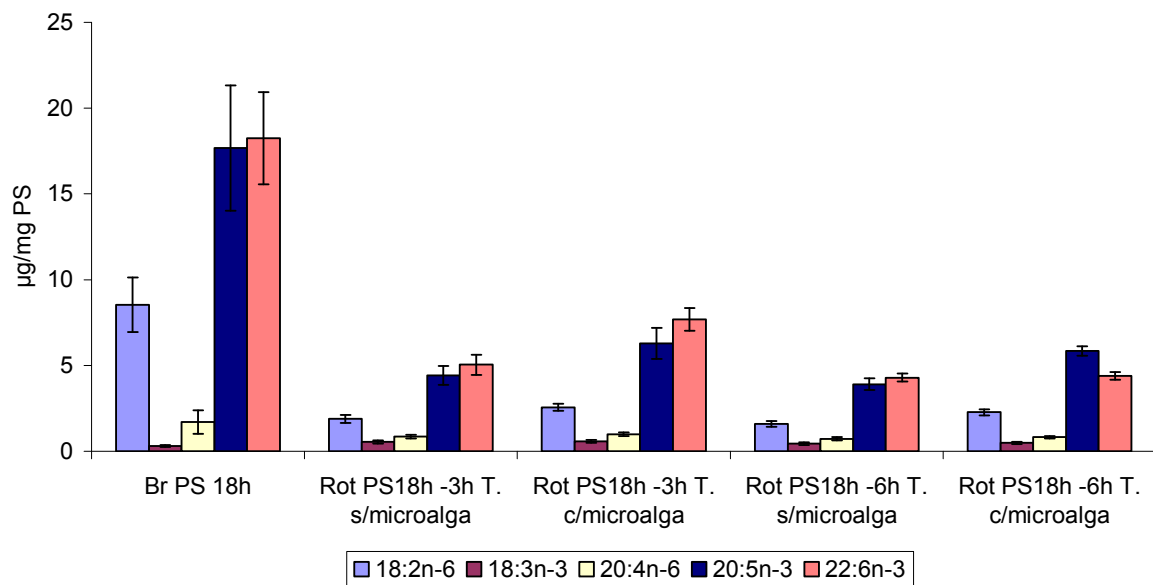


Figura 33 – Perfil nos ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos 18h em Protein Selco® e 3h e 6h em tanques com e sem microalga (*Nannochloropsis gaditana*).

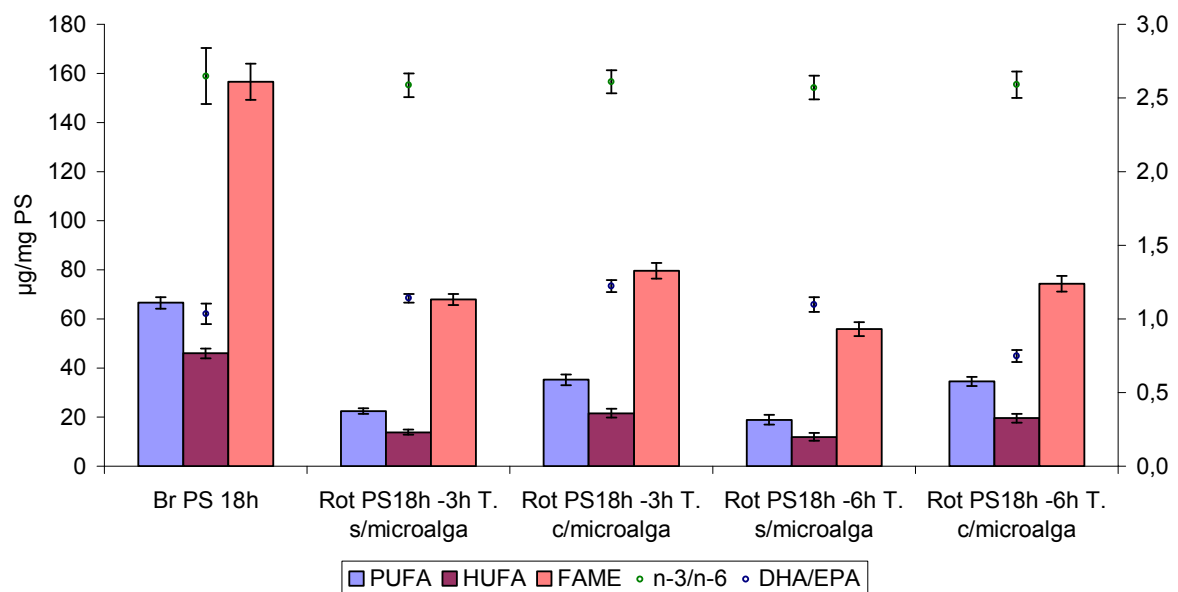


Figura 34 – Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos 18h em Protein Selco® e 3h e 6h em tanques com e sem microalga (*Nannochloropsis gaditana*).

- Bioencapsulação de rotíferos com Protein Selco<sup>®</sup>, Super Rotifer<sup>®</sup> e com *Nannochloropsis gaditana* em cinco diferentes tempos de enriquecimento. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Com o objectivo de comparar a evolução do enriquecimento nos três ácidos gordos essenciais, ARA (20:4n-6) EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3), procedeu-se à bioencapsulação de rotíferos com dois produtos comerciais (Protein Selco<sup>®</sup> e Super Rotifer<sup>®</sup>), utilizando as doses aconselhadas pelo fabricante para cada refeição, e com microalga verde *Nannochloropsis gaditana* para períodos de 4h, 6h 18h e 24h. Os valores obtidos corroboram os anteriormente referidos, verificando-se que (Figura 35):

- O tempo mínimo de enriquecimento se situa nas 18h:
- Os produtos comerciais requerem doses intermédias ao fim de 6h-10h
- Ao fim de 24h, no caso dos produtos comerciais a água dos tanques de enriquecimento poderá ter atingido níveis de qualidade bastante baixos, pela oxidação de produto não consumido.
- Os rotíferos reflectem, de uma maneira geral, o perfil em ácidos gordos do produto utilizado.

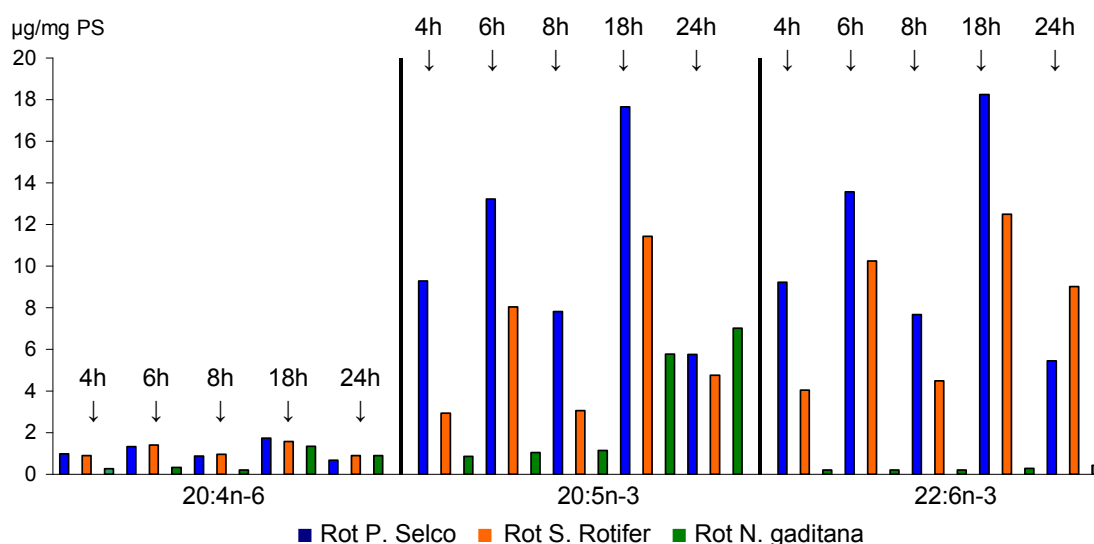


Figura 35 – Variação do perfil nos ácidos gordos essenciais para peixes marinhos, de rotíferos enriquecidos em Protein Selco<sup>®</sup>, Super Rotifer<sup>®</sup> e *Nannochloropsis oculata* em função do tempo de alimentação.

As metodologias empregues na determinação e quantificação dos ácidos gordos podem ser consultadas em Pousão-Ferreira *et al*, 1999.

- Bioencapsulação de rotíferos com ovos de dourada. Efeito no perfil em ácidos gordos.

Com o objectivo de encontrar emulsões/produtos alternativos que possam ser utilizadas para se obter um perfil em ácidos gordos o mais adequado às larvas dos peixes marinhos procedeu-se à bioencapsulação de rotíferos com ovos de dourada. Numa maternidade devido ao comportamento reprodutor desta espécie, existe uma grande abundância de ovos que não são aproveitados. Do ponto de vista de uma unidade comercial, existe toda a vantagem de os tanques larvares serem preenchidos o mais em simultâneo possível. Esta vantagem prende-se com a gestão da cadeia alimentar e com a obtenção de lotes de juvenis com idades próximas. Deste modo, o lote de reprodutores está normalmente sobredimensionado de modo a se obterem grandes quantidades de ovos por dia. Durante o restante período em que os tanques larvares estão ocupados estes ovos não são utilizados. Procedeu-se à liofilização dos ovos para verificar se este método permitia armazenar os ovos em excesso, sem perderem as suas qualidades nutritivas, e se seria fácil a sua emulsão para enriquecimento.

Tendo em conta estas circunstâncias procedeu-se à análise da sua utilização na bioencapsulação de rotíferos tendo-se obtido interessantes resultados como se pode constatar no artigo Pousão-Ferreira, P. *et al*, 1999.

## Considerações finais

De um modo geral podemos tecer as seguintes considerações e recomendações sobre a produção de rotíferos para alimentar as larvas de peixes marinhos:

1. O crescimento da população - para assegurar uma melhor taxa de crescimento e de produção de ovos (amícticos) de *B. plicatilis* a salinidade deve situar-se próxima de 20 e a temperatura deve situar-se entre 22 °C e 25 °C. No caso de *B. rotundiformis* a temperatura deve situar-se bastante acima dos 20°C entre os 28°C e 30°C e a salinidade deve situar-se próxima de 20;
2. O alimento – este é composto por microalgas e/ou por leveduras (levedura de padeiro ou leveduras comerciais enriquecidas);
3. A bioencapsulação – os rotíferos são cultivados com produtos que satisfazem as suas necessidades nutricionais mas não as das larvas dos peixes marinhos a que se destinam como alimento. Deste modo, previamente ao seu fornecimento, têm de ser alimentados (bioencapsulados ou enriquecidos) com produtos nutricionalmente adequados às larvas:
4. A bioencapsulação com microalgas - deve ser feita com concentrações até 1500 rot.mL<sup>-1</sup>. O enriquecimento deve ser prolongado, durante pelo menos 24 h, de forma a se conseguir uma melhor incorporação dos ácidos gordos essenciais aos peixes marinhos. Uma mistura de espécies de microalgas como *Nannochloropsis* spp. e *Isochrysis* spp. permite obter perfis de ácidos gordos essenciais mais equilibrados;
5. A bioencapsulação com emulsões de óleos (de animais marinhos e vegetais) - permite obter diferentes perfis nos rotíferos consoante o óleo utilizado. Os óleos de origem vegetal não permitem obter perfis adequados às larvas dos peixes marinhos,
6. A bioencapsulação com produtos comerciais - permite obter perfis de ácidos gordos essenciais nos rotíferos bastante superiores aos obtidos com microalgas, mas abaixo do perfil que vamos encontrar nos ovos e nas larvas recém-eclodidas. O tempo de bioencapsulação deverá ser prolongado, em

relação ao normalmente recomendado pelo fabricante (de 4 h a 8 h). Períodos de tempo de 18 h a 24 h permitem obter melhor perfil em ácidos gordos essenciais, mas deve ter-se em consideração a disponibilidade do produto no meio e a manutenção da qualidade da água.

7. A bioencapsulação com ovos de dourada – permite obter o melhor perfil em ácidos gordos essenciais nos rotíferos, pelo que é um sub-produto a considerar.
8. O perfil em ácidos gordos essenciais – obtido após a bioencapsulação com microalgas, emulsões com óleos ou produtos comerciais não se mantém quando os rotíferos estão em inanição. Ao fim de 3 h, os rotíferos perdem parte do seu conteúdo em ácidos gordos e ao fim de 24 h apresentam um conteúdo semelhante aos cultivados em levedura de padeiro (sem EPA e DHA). Como o conteúdo em EPA e DHA, obtido nos rotíferos com emulsões comerciais é bastante superior ao obtido com microalgas, a sua diminuição também é bastante mais acentuada.
9. Os rotíferos reflectem - de uma maneira geral, o perfil em ácidos gordos do produto utilizado na sua bioencapsulação. Por sua vez, as larvas dos peixes marinhos que os consomem vão reflectir o perfil das presas.

Deste modo, pela análise da bioencapsulação dos rotíferos com diferentes produtos poderá concluir-se que os rotíferos cultivados em levedura não têm qualidade nutritiva nos principais ácidos gordos e grupos de ácidos gordos, para as larvas dos peixes marinhos sendo necessário proceder à sua bioencapsulação, antes de fornecer às larvas. Dos restantes produtos utilizados verifica-se que as microalgas apresentam valores relativamente baixos para os mesmos ácidos gordos, variando a composição de acordo com a espécie utilizada. A mistura de diferentes espécies de microalgas poderá melhorar o perfil, nomeadamente em DHA e EPA. A emulsão preparada em laboratório com óleo de fígado de bacalhau apresenta um perfil semelhante a alguns produtos comerciais, superior às microalgas mas inferior ao Protein Selco<sup>®</sup> e à bioencapsulação com ovos frescos de dourada (em DHA e n-3/n-6). Com a bioencapsulação dos rotíferos com ovos

frescos de dourada, conseguem-se os valores mais elevados de DHA, a melhor razão n-3/n-6 e melhor razão DHA/EPA.

Como estratégia alimentar deverão deixar-se sair do tanque os rotíferos não consumidos e ir acrescentando rotíferos recém bioencapsulados, com melhor perfil em ácidos gordos essenciais.

Verifica-se também que existe a necessidade de encontrar fontes de ácidos gordos alternativas que vão mais de encontro ao perfil encontrado nos ovos e larvas das várias espécies. No presente trabalho foi justamente encontrada esta fonte, i.e. óleo de ovos de dourada, que como referimos acaba por ser um importante sub-produto não aproveitado nas maternidades.

Também deverá considerar-se que com o aumento da produção em aquacultura poderão vir a escassear os óleos de peixe, fonte de muitos dos produtos de enriquecimento.

## Referências bibliográficas

1. Abu-Rezq, T.; Al-Abdul-Elah, K.; Duremdez, R.; Al-Marzouk, A.; James, C. M.; Al-Gharabally, H. & Al-Shimmari, J., 2002. Studies on the effect of using the rotifer, *Brachionus plicatilis*, treated with different nutritional enrichment media and antibiotics on the growth and survival of blue-fin sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes), larvae. *Aquaculture Research* 33 (2): 117–128.
2. Alver, M. O.; Alfredsen, J. A. & Olsen, Y., 2006. An individual-based population model for rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Hydrobiologia* 560: 93–108.
3. Amat, F., 1985. Cultivos auxiliares: Zooplâncton. *Primer Curso Teórico Prático sobre Acuicultura*. (Madrid: Marzo-Abril, 1985). Ministério da Agricultura Pesca y Alimentation, 5: 319-337.
4. Andoa, Y.; Kobayashia, S.; Sugimoto, T. & Takamarub, N., 2004. Positional distribution of n<sub>3</sub> highly unsaturated fatty acids in triacyl-sn-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG. *Aquaculture* 229: 275–288.
5. Aragão, C.; Conceição, L. E. C.; Dinis, M. T. & Fyhn, H. J., 2004. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*. 234: 429–445.
6. Araujo, A. & Hagiwara, A., 2005. Screening methods for improving rotifer culture quality. *Hydrobiologia* 546: 553–558.
7. Assavaaree, M.; Hagiwara, A.; Kogane, T. & Arimoto, M., 2003. Effect of temperature on resting egg formation of the tropical SS-type rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Fisheries Science*. 69: 520–528
8. Balompapueng, M.D.; Hagiwara, A.; Nishi, A.; Imaizumi, K. & Hirayama, K., 1997a. Resting egg formation of the rotifer *Brachionus plicatilis* using a semi-continuous culture method. *Fisheries Science*, 63 (2): 236-241.
9. Balompapueng, M.D.; Munuswamy, N.; Hagiwara, A. & Hirayama, K., 1997b. Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Muller. *Aquaculture Research*, 28 (7): 559-565.
10. Barnes, R.D., 1987. Invertebrate Zoology. *CBS College Publishing*, New York. 893pp.



11. Bennett, W. & Boraas, M. E., 1988. Isolation of a fast-growing strain of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas using turbidostat culture. *Aquaculture* 73: 27-36.
12. Castell, J.; Blair, T.; Neil, S.; Howes, K.; Mercer, S.; Reid, J. & Young-Lai, W.; Gullison; B; Dhert, P. & Sorgeloos, P., 2003. The effect of different HUFA enrichment emulsions on the nutritional value of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed to larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture International* 11: 109–117.
13. Cheng, S-H.; Aokib, S.; Maedac, M. & Hinob, A., 2004. Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* on two different algae. *Aquaculture* 241: 331–343.
14. Chotiyaputa, C. & Hirayama, K., 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. *Mar. Biol.* 45: 105–111.
15. Dhert, P., 1996. “Rotifers”. In: “Manual on the production and use of live food for aquaculture” (Patrick Lavens and Pratricks Sorgeloos, eds.), pp.49-78. FAO - *Fisheries Technical Paper*, 361. Rome.
16. Dhert, P.; Rombaut, G.; Suantika, G. & Sorgeloos, P., 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200: 129 - 146.
17. Dinis, M.T. 1986. Quatre Soleidae de l’Estuaire du Tage -Reproduction et Croissance - Essai d’Elevage de *Solea senegalensis* Kaup, Tese de Doutoramento, Univ. Bretagne Occidental, França, 352pp.
18. Fernandez-Reiriz, M. J. & Labarta, U., 1996. Lipid classes and fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) fed two algal diets. *Hydrobiologia*. 330 (1): 73-79.
19. Gallardo, W. G.; Hagiwara, A.; Tomita, Y.; Soyano, K. & Snell, T. W., 1997. Effect of some vertebrate and invertebrate hormones on the population growth, mictic female production, and body size of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia* 358: 113-120.
20. Gallardo, W. G.; Hagiwara, A.; Tomita, Y. & Snell, T. W., 1999. Effect of growth hormone and  $\gamma$ -aminobutyric acid on *Brachionus plicatilis* (Rotifera) reproduction at low food or high ammonia levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 240 (2): 179-191.

21. Gallardo, W. G.; Hagiwara, A. & Snell, T. W., 2001. Use of GABA to enhance rotifer reproduction in enrichment culture. *Aquaculture Research*, 32: 243-246.
22. Gomez-Gil, B.; Roque, A. & Turnbull, J. F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259–270.
23. Gomez-Gil, B.; Thompson, F. L.; Thompson, C. C. & Swings, J., 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 239–243.
24. Hansen, B.; Wernberg-Moller, T. & Wittrup, L., 1997. Particle grazing efficiency and specific growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 215: 217-233.
25. Hamada, K.; Hagiwara, A.; Hirayama, K., 1993. Use of preserved diet for rotifer *Brachionus plicatilis* resting egg formation. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59 (1): 85-91.
26. Hagiwara, A.; Hamada, K.; Nishi, A.; Imaizumi, K. & Hirayama, K., 1993. Mass production of rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs in 50 m super(3) tanks. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59 (1): 93-98.
27. Hino, A. & Hirano, R., 1980. Relationship between body size of rotifer *Brachionus plicatilis* and the maximum size of particles ingested. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46 (10): 1217-1222.
28. Hirayama, K. & Funamoto, H., 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49 (4): 505-510.
29. Hirayama, K. & Hagiwara, A., 1995. Recent advances in biological aspects of mass culture of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in Japan. In "Selected Papers From a Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish, Bergen, Norway, 21-23 June 1993" (Pittman, K.; Batty, R.S.; Verreth, J., eds.), vol. 201: pp. 153-158.
30. Hotos, G. N., 2002. Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research* 33 (12): 949–957.

31. Kitajima, C., 1986. Fry producing techniques of red sea bream, *Pagrus major*, in Japan. FAO-MEDRAP, Jugoslávia: 272-300.
32. Korstad, J.; Olsen, Y. & Vadstein, O., 1989. Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (rotifera) fed different algae. *Hydrobiologia* 186/187: 43–50.
33. Kotani, T. & Hagiwara, A., 2003. Fertilization between rotifer *Brachionus plicatilis* strains at different temperatures. *Fisheries Science* 69: 1078–1080.
34. Kotani, T., Ihara, K. & Hagiwara, A., 2006. Cross-mating of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* strains as a means to develop useful strains for larval fish food. *Aquaculture* 261: 495–500.
35. Lowe, C. D.; Kemp, S. J.; Bates, A. D. & Montagnes, D. J. S., 2005. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology* 146: 923–929.
36. Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147: 245-255.
37. Lubzens, E. and Zmora, O. 2003. Production and nutritional value of rotifers. In:” Live Feeds in Marine Aquaculture” (Stottrup, J.G. and McEvoy, L.A., eds.), pp.17-52. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
38. McEvoy, L.A.; Navarro, J.C.; Bell, J.G. & Sargent, J.R., 1995 Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134 (1-2):101-112.
39. Martínez-Díaz, S. F.; Álvarez-González, C. A.; Legorreta, M. M. Vázquez-Juárez, R. & Barrios-González, J., 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* 11: 95–108.
40. Navarro, N.; Manuel Yúfera, M. & García-Gallego, M., 2001. Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. II. Biochemical composition. *Hydrobiologia* 452: 69–77.
41. Planas, M.; Vázquez, J. A.; Marqués, J.; Pérez-Lomba, R.; González, M. P. & Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 240: 313–329.
42. Pourriot, R. 1989. Les rotifères - Biologie. In “Aquaculture. Vol.1-Technique et Documentation” (Barnabé, G. ed.), pp. 202-221, 2ªed, Lavoisier, Paris.

43. Pousão-Ferreira, P.; Luis, O.; Passos, A. & Narciso, L., 1996. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Brachionus plicatilis* for sea bream (*Sparus aurata*) larvae. In: Live Food Organisms and Marine Larviculture, Nagasaki, Japão, 1-4 September 1996, 5pp.
44. Pousão-Ferreira, P.; Dores, E.; Luis, O.; Passos, A. & Narciso, L. 1997. Fatty acids profile of enriched *Brachionus plicatilis* on different commercial oils and emulsions for the sea bream (*Sparus aurata*) larvae. In "Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, EAS-WAS-CAA-ADA-ADAM. Martinique, May 4-9, 1997", *Short Communications and abstract*, pp. 243-245.
45. Pousão-Ferreira, P.; Morais, S.; Dores, E. & Narciso, L., 1999. Eggs of gilthead seabream *Sparus aurata* L. as a potential enrichment product of *Brachionus* sp. In the larval rearing of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Research* 30(10):751-758.
46. Robin, J.H.; Gatesoupe, F.; Stephan, G.; Le Delliou, H. & Salaun, G. 1984. Méthodes de production de filtreus-proies et amelioration de leur qualité alimentaire. *Oceanis* 10 (5): 497-504.
47. Rodríguez, C.; Pérez, J. A.; Izquierdo, M. S.; Cejas, J. R.; Bolaños, A.; Lorenzo, A., 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture* 147(1-2):93-105.
48. Ruttner-Kolisko, A., 1986. Individual feeding experiments with several planktonic rotifer species. *Wasser Ab Wasser* 30: 465-481.
49. Sarma, S. S. S.; Gulati, R. D. & Nandini, S., 2005. Factors affecting egg-ratio in planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 546: 361-373.
50. Sorgeloos, P., 1995. Live feeds and their substitution products for larval nutrition of fish, shrimp and prawn. In "Fifth International Course on Fish Larvae Nutrition, (1-9 May 1995), ERASMUS ICP-94/NL-1139/01, IX- 1-34. Wageningen, Netherlands.
51. Souto, M.; Pousão-Ferreira, P.; Saavedra, M.; Luna, A. & Herrero, C., 2005. Transferencia de riboflavina del rotífero *Brachionus plicatilis* O. F. Müller a larvas de sargo *Diplodus sargus* L. X Congreso de Nacional Acuicultura. Gandia, Valência, 17-21 Outubro 2005. Tomo II, pp.266.

52. Srivastava, A.; Hamre, K.; Stoss, J.; Chakrabarti, R. & Tonheim, S. K., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture* 254: 534–543.
53. Suantika, G.; Dhert, P.; Sweetman, E.; O'Brien, E. & Sorgeloos, P., 2003. Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. *Aquaculture* 227: 173–189.
54. Vine, N. G.; Leukes, W. D. & Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30: 404–427.
55. Watanabe, T.; Oowa, F.; Kitajima, C.; Fujita, S. & Yone, Y., 1979. Relationship between the dietary value of rotifers *Brachionus plicatilis* and their content of  $\omega$ 3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45 (7): 883-889.
56. Watanabe, T.; Tamiya, T.; Oka, A.; Hirata, M.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1983a. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on  $\omega$ 3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 49 (3): 471-479.
57. Watanabe, T.; Kitajima, C. & Fujita, S., 1983b. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
58. Yoshimura, K.; Tanakab, K. & Yoshimatsu, T., 2003. A novel culture system for the ultra-high-density production of the rotifer, *Brachionus rotundiformis* — a preliminary report. *Aquaculture* 227: 165–172.
59. Yu, J.P.; Hino, A.; Ushiro, R. & Maeda, M., 1989. Function of bacteria as vitamin B<sub>12</sub> producers during mass culture of the rotifer *B. plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (10): 1799-1806.
60. Yúfera, M. & Pascual, E., 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina." *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.* 119 (29): 3-27.
61. Yúfera, M., 2001. Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research. *Hydrobiologia* 446-447: 383-392.

## CAPITULO III

### Zooplâncton - Artémia (*Artemia* spp.)

#### Introdução

*Artemia* spp., é um crustáceo branquiópode, encontrando-se em todos os continentes, em salinas ou lagos salgados - acima de 70 de salinidade onde os predadores não sobrevivem -, sendo relativamente fácil, antes da época das chuvas, encontrar os seus ovos junto à margem, arrastados pelo vento. Estes ovos, com cerca de 200-300µm de diâmetro, são cistos em diapausa (fase de dormência), como forma de adaptação a condições ambientais adversas (como a temperatura e a salinidade) e que após rehidratação dão origem a novos animais (Figs.1 e 2). A dimensão de *Artemia* spp. varia entre cerca de 0,45mm (náuplio) e 1,5 cm (adulto).

Inicialmente, a espécie foi classificada taxonomicamente como *Artemia salina*, tendo sido identificada pela primeira vez em salinas de Lymington em Inglaterra. Posteriormente, constatou-se um elevadíssimo grau de polimorfismo entre indivíduos de diferentes origens (espécies gémeas) e como não há acordo entre

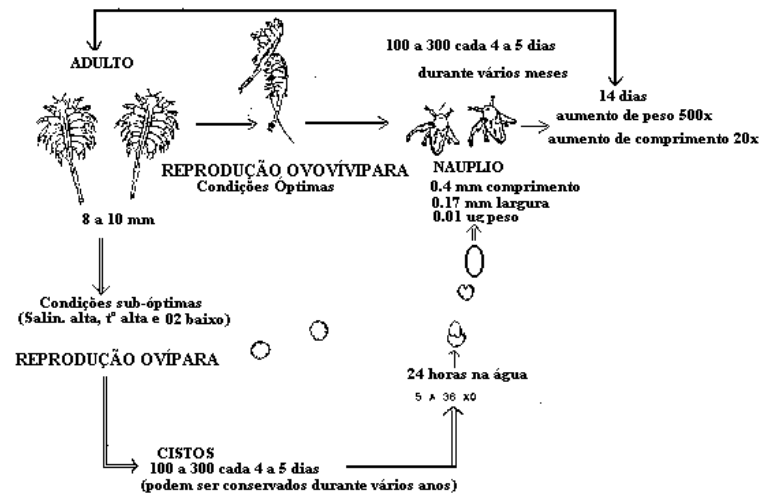


Figura 1 – Ciclo de vida de *Artemia* spp. (Adaptado de M.T.Dinis).

os diversos autores, quanto à sistemática do género *Artemia*, foi decidido, no 1º Simpósio Internacional sobre *Artemia salina* (Corpus Christi, Texas 1980), apenas utilizar o género ou o termo estirpe de *Artemia* sp. O termo estirpe,

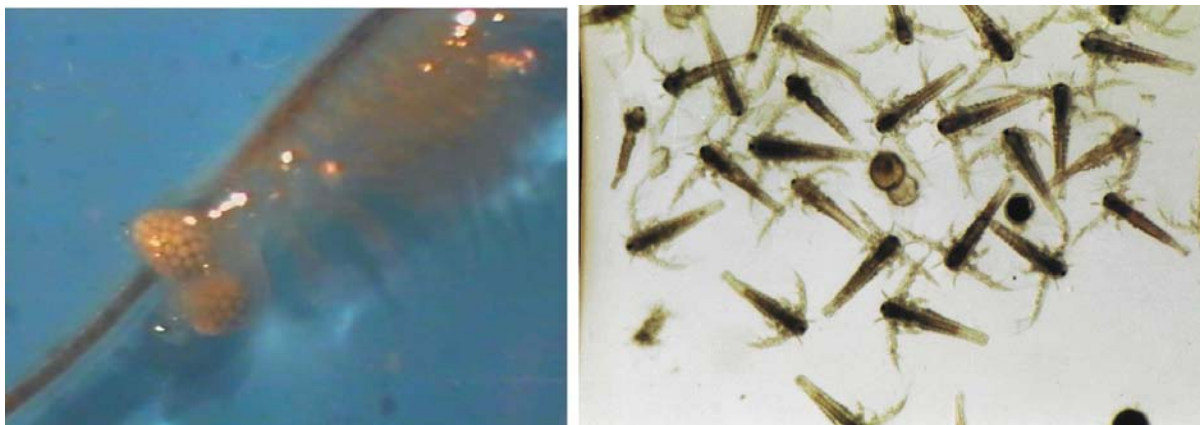


Figura 2 – *Artemia spp.* adulta com ovos (I) e ovos e nauplios (II).

não tem valor taxonómico servindo apenas para identificar diferentes locais de colheita, com ou sem diferenças morfológicas (Narciso, 1987). No entanto, embora alguns autores continuem a considerar apenas a designação *Artemia sp.* devido à dificuldade de uma correcta identificação, actualmente consideram-se já algumas espécies como *Artemia franciscana*, *Artemia persimilis*, *Artemia sinica* e *Artemia salina* (= *Artemia tunisiana*) e *Artemia urmiana*.

Quanto à reprodução *Artemia sp.* pode ser sexuada, com machos e fêmeas em igual proporção, ou pode ser partenogénica. A alteração do seu comportamento reprodutor surge como resposta a condições adversas do meio (ex: secas, temperaturas extremas, salinidade muito elevada, escassez de alimento).

Ensaio realizados em laboratório indicam que para a mesma temperatura o fotoperíodo parece ser determinante. Com fotoperíodo mais curto (inferior a 12L:12E) a oviparidade é dominante (Nambu *et al.*, 2004).

Em ambos os casos as fêmeas poderão produzir dois tipos de ovos, em função de adaptação a condições ambientais:

- Aqueles cujo desenvolvimento embrionário se desenrola dentro do útero da fêmea, nascendo directamente sob a forma de náuplios livres (ovoviviparidade).
- Os que ao chegarem ao estágio de gástrula incipiente, dentro do útero da fêmea, param o seu desenvolvimento, são cobertos por um córion resistente procedente das glândulas da casca e libertados sob a forma de cistos (oviparidade). Este comportamento está perfeitamente determinado, independentemente da espécie ou estirpe e quaisquer que sejam as condições ambientais (Lavens & Sorgeloos, 1987).

O córion ou casca é de natureza lipoproteica impregnada de quitina e de

hematina. Esta tem um papel importante na manutenção da estrutura e protecção contra as radiações ultra-violetas. A concentração em hematina determina a cor do córion - mais ou menos escura (Stappen, 1996).

Os cistos são gástrulas em diapausa ou criptobiose como forma de assegurarem a sobrevivência da espécie resistindo às condições desfavoráveis do meio. A criptobiose define-se como a inexistência completa de vida em que os processos metabólicos estão ausentes ou dificilmente mensuráveis (Keilin, 1959). Quanto á influência de factores na adopção dum estado criptobiótico, *Crowe et al* (1987) definiram duas formas deste estado:

- Dormência, como uma forma em que existe o controle endógeno do metabolismo e desenvolvimento-

- Quiscência, como uma forma em que existe o controle exógeno (factores ambientais extremos) sobre o metabolismo e desenvolvimento; o reinício do metabolismo só terá lugar quando as condições do meio forem de novo favoráveis. Consoante o factor em causa poderemos ainda definir várias formas de quiscência como sejam anidrobiose (dessecação), criobiose (baixas temperaturas), anoxibiose (falta de oxigénio), que após desidratação podem resistir às condições adversas do meio. Neste sentido podemos considerar que os cistos são gástrulas que se encontram primeiro num estado de dormência e posteriormente num estado de quiscência, em que a interrupção do metabolismo dos cistos foi induzida por factores endógenos antes de as condições ambientais se tornarem desfavoráveis (Drinkwater & Clegg, 1991);

Os cistos que são largados pelas fêmeas, em estado de dormência, não eclodirão mesmo que as condições ambientais sejam favoráveis, sem que se dê a interrupção da diapausa. Esta interrupção é controlada por mecanismos internos, responsáveis pela indução da diapausa, que têm de ser desactivados. Esta desactivação pode acontecer ou ser provocada por desidratação dos cistos, por dessecação ao ar nas margens da salina ou por desidratação em meios hipersalinos (300g/l - remoção osmótica da água) ou por choques térmicos (35-40°C), embora com diferenças de acordo com as estirpes. Após a interrupção do estado de dormência os cistos entram no estado de quiscência podendo o metabolismo reiniciar-se quando ocorrerem condições ambientais favoráveis para a eclosão (Stappen, 1996).

Quando as condições do meio forem favoráveis, após cerca de 24 horas de



hidratação, retomam o seu desenvolvimento eclodindo as larvas. Os cistos podem sofrer sucessivos ciclos de hidratação/desidratação, embora com crescente perda energética.

## Estirpes

Estirpe significa lote, semelhantes da mesma espécie ou não, do mesmo lugar ou não mas sem valor taxonómico.

*Artemia* sp., é um alimento ideal para peixes e crustáceos que possam ingerir presas de dimensão superior a 0,5mm (Sorgeloos *et al.*, 1987). A sua utilização em aquacultura e aquariofilia deve-se a vários factores:

- Disponibilidade de cistos. Os cistos são embriões, na fase de gástrula em estado de diapausa ou criptobiose, podendo ser conservados por longos períodos e que eclodem, ao fim de 24-36 horas, quando são introduzidos em água, em condições ambientais adequadas. Ao eclodirem dão origem a náuplios ou estado larvar *instar I*.
- Facilidade de cultura em grandes concentrações, cerca de 250 náuplios por mililitro, e crescimento rápido, de cerca de 450µm a 1,5 cm em 15 dias (25°C). O seu crescimento e facilidade de manipulação permite a sua utilização em diversas fases dos cultivos larvares de acordo com a dimensão da larva, uma vez que presas de maiores dimensões diminuem o esforço de captura por parte das larvas e são necessárias em menor número.
- Possibilidade de modificação do seu perfil nutritivo com a bioencapsulação com produtos adequados (ricos em ácidos gordos polinsaturados, vitaminas, etc.). Neste caso no estado larvar *instar II*, visto os náuplios (*instar I*) ainda não possuem tubo digestivo funcional,
- Possibilidade de servirem como veículo de transporte de substâncias para as larvas (ex. antibióticos).

Existem no mercado cistos de diversas estirpes de *Artemia* sp. com diferentes proveniências, com diferentes dimensões e diferente composição em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) que, são de grande importância para as larvas de peixes marinhos, como fonte de energia e como constituintes dos fosfolípidos das membranas celulares (Gozalbo *et al.*, 1987; Gozalbo *et al.*, 1989; Koven *et al.*, 1992; Tuncer *et al.*, 1993; Yúfera & Pascual, 1984; Watanabe *et al.*, 1978; Watanabe *et al.*,

1982; Watanabe *et al.*, 1983a).

Os cistos podem ser comercialmente produzidos em tanques com uma coluna de água com cerca de 40 cm e com as condições abióticas adequadas, nomeadamente a salinidade, a temperatura, e o pH (Singh & Khandagale, 2006).

A conservação dos cistos deverá ser feita de modo a que permaneçam secos (desidratados), de preferência em vácuo, e a baixas temperaturas. Podem mesmo ser congelados mas deverão estar uma semana à temperatura ambiente antes de serem postos a eclodir (Stappen, 1996).

### **Estirpes e sua utilização**

Do ponto de vista da aquacultura é de grande importância conhecer características da estirpe que se está a utilizar no que se refere a diâmetro dos ovos e dimensão dos náuplios, perfil bioquímico, taxa e sincronismo de eclosão, taxa de crescimento, entre outras. As estirpes de menores dimensões e mais ricas em HUFA, por exemplo Great Salt Lake, Utah, são utilizadas nas primeiras fases larvares dos peixes marinhos, em que se utilizam directamente náuplios (*instar I*) recém-eclodidos, devido aos seguintes factores:

- Menor dimensão dos náuplios,
- Maior valor nutritivo.

Devido a esta característica o seu valor comercial é muito elevado, sendo utilizadas apenas para produção de náuplios.

As outras estirpes utilizam-se numa fase posterior (náuplios de *instar II* e *III*), quando as larvas já consomem presas de maiores dimensões, em que os náuplios são previamente bioencapsulados, pelo que o seu valor nutritivo vai depender do produto utilizado na bioencapsulação. Estas estirpes apresentam um custo/Kg de cistos muito mais baixo.

Comercialmente estas estirpes aparecem muitas vezes com designação diferentes como por exemplo AF (Inve<sup>®4</sup>) para as mais pequenas e de maior valor nutritivo e EG (Inve<sup>®</sup>) para as outras. As primeiras são substancialmente mais dispendiosas.

Para avaliar a potencialidade dos cistos utilizam-se, em condições de eclosão

---

<sup>4</sup> INVE Aquaculture NV, Baasroad, Belgium

pradonizada, os seguintes índices (Vanhaecke & Sorgeloos, 1980; Vanhaecke & Sorgeloos, 1983; Liao *et al.*, 1983; Narciso, 2000):

1- Eficiência de eclosão (**HE** - hatching efficiency) = nº de náuplios obtidos a partir de 1g de cistos em  $\Delta t$ .

2- Percentagem de eclosão (**H %** - hatching percentage) = nº de náuplios eclodidos sobre o total de cistos utilizados, Este parâmetro também pode ser referido como taxa de eclosão (**HR** - hatching rate),

3- Sincronismo de incubação (**T<sub>90</sub> - T<sub>10</sub>** incubation time) =  $T_s$

$T_s$  = diferencial entre 90% e 10% de eclosão. Este parâmetro também pode ser referido como sincronismo de eclosão (**HS** - hatching synchrony),

5-  $T_{50}$  = Tempo até a eclosão de 50% dos cistos;

6- Peso seco individual e conteúdo energético dos náuplios em estado *instar* I,

7- Biomassa da eclosão = mg náuplios em peso seco a partir de 1g de cistos.

Os cistos com um valor elevado de **HE** e **H%** são economicamente mais interessantes. No entanto, os cistos com menor índice  $T_{50}$  são mais interessantes do ponto de vista prático por permitirem obter náuplios em menos tempo. Outro factor de importância é o sincronismo de incubação (**T<sub>s</sub>**) ou sincronismo de eclosão (**HS**) de forma a se obterem náuplios na mesma fase de desenvolvimento larvar com a mesma dimensão e valor energético. É bastante mais simples para se trabalhar numa maternidade quando temos um bom sincronismo de eclosão, que permite um melhor planeamento da colheita, distribuição às larvas ou enriquecimento dos náuplios,

Os cistos com maior peso individual e maior conteúdo energético devem ser escolhidos por apresentarem melhor valor nutritivo.

### Obtenção de náuplios

Os cistos desidratados têm uma forma bicôncava e são higroscópicos, aumentando de volume e ficando com a forma esférica ao fim de 1 a 2 horas após a inclusão em água (Figs. 3 e 4).

Quando se interrompe a diapausa o metabolismo de eclosão do cisto é activado.

O metabolismo aeróbio do embrião vai provocar a conversão do carbohidrato de reserva - trealose - em glicogénio (como fonte de energia) e em glicerol, o qual se vai acumular entre o embrião e a membrana cuticular externa (Dhont & Stappen, 2003; Narciso, 2000), (Fig. 5).

Quando o embrião está completamente desenvolvido, o córion rompe-se como resultado da acumulação de glicerol.

O glicerol como é um composto muito higroscópico vai induzir uma ainda maior absorção de água. Esta acumulação de água provoca um aumento da pressão osmótica externa que origina a rotura quer da membrana cuticular externa quer da própria casca do cisto (córion), (Narciso 2000; Stappen, 1996). Este processo de rotura da casca do cisto é meramente físico denominando-se muitas vezes por sistema hiperosmótico trealose-glicerol (Narciso, 2000). Pode ser efectuado em meios sem quaisquer sais em solução (água doce) mas em salinidades elevadas será necessário uma maior síntese de glicerol para absorver água. Em salinidades demasiado elevadas, poderá atingir-se um ponto de limite, ou seja a pressão osmótica interna poderá não ser suficientemente elevada para a rotura da casca do cisto (Narciso, 2000). Para os cistos eclodirem em salinidades elevadas terão de ser sintetizadas maiores quantidades de glicerol diminuindo as substâncias de reserva, levando a que os náuplios que eclodem tenham menor energia (Sorgeloos, 1980).



Figura 3 – Cistos e nauplio recém-eclodido. (Desenho de F. Cairrão).



Figura 4 – Ovos de *Artemia* spp. desidratados (I e II) e hidratados (III).

A rotura da casca (córion) dá-se ao fim de 12 a 20 horas de hidratação, dependendo da estirpe e da temperatura de incubação, e o embrião rodeado por uma membrana embrionária transparente emerge lentamente e fica visível. A membrana embrionária, poderá ainda ficar ligada à casca, provavelmente pela membrana cuticular interna. Nesta fase é segregada um enzima de eclosão, na região anterior do embrião, que enfraquece a membrana. O náuplio inicia uma série de movimentos, rompe a membrana e liberta-se para o exterior (Wheeler *et al.*, 1979; Stappen, 1996). Quando o córion se rompe ocorre a fase de pré-emergência e, quando o náuplio emerge rodeado pela membrana embrionária ocorre a de "umbrella" ou pré-naulio. Após o rompimento desta membrana, o náuplio encontra-se na fase *instar* I: possui 450-475 µm de comprimento, a sua cor é alaranjada devido às reservas vitelinas que possui e nada através do batimento das antenas (Figs. 6 e 7).

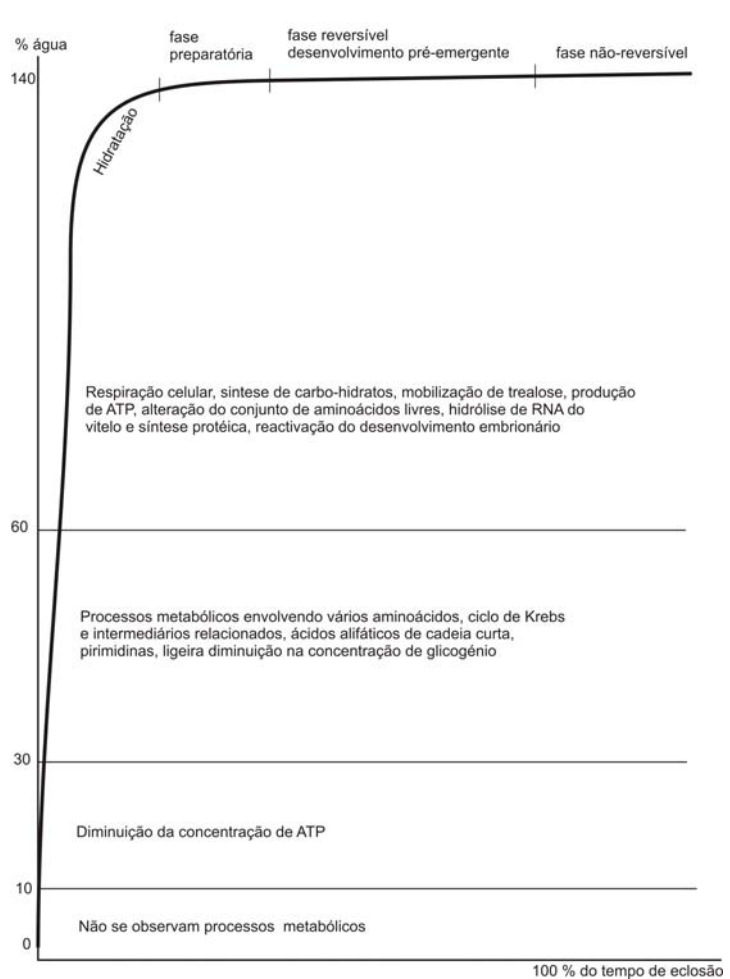


Figura 5 - Metabolismo celular dos cistos de *Artemia* spp. (em função do nível de hidratação). (Adaptado de Dhont & Stappen, 2003).



Figura 6 – Eclosão de *Artemia* spp.

Uma das características que nos permite distinguir este estado *instar* dos seguintes é a morfologia do espinho gnátobasal, que neste é unirramoso e sem

sedas. Na fase *instar* II, após a 1ª muda, o náuplio possui entre 600 e 650 µm de comprimento e é mais translúcido; o espinho gnátobasal é unirramoso e com sedas. Após a 2ª muda, ocorre a fase *instar* III, metanáuplio, possuindo o náuplio entre 700 e 800 µm, as reservas vitelinas estão praticamente esgotadas e o espinho gnátobasal é birramoso e com sedas. Outro modo de diferenciar as fases *instar* baseia-se a forma do corpo, dado que o crescimento é mais longitudinal que transversal (Anderson, 1967).

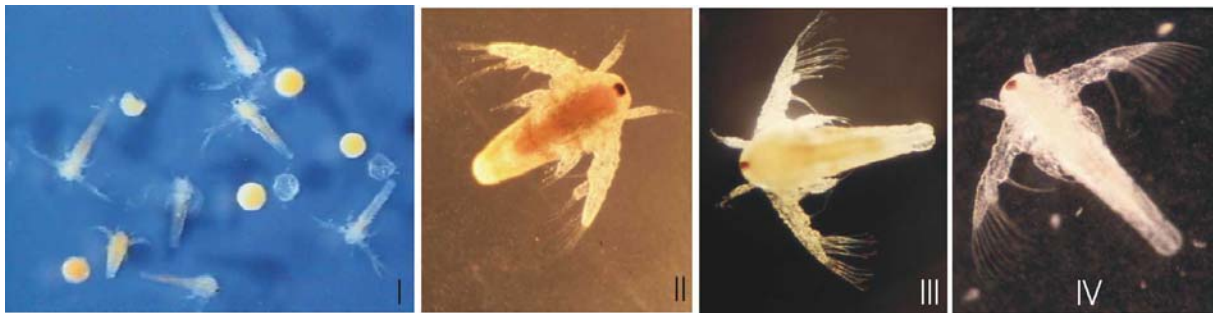


Figura 7 – Náuplios de *Artemia* spp.

Os náuplios em *instar* I possuem muito mais reservas lipídicas, que vão decrescendo para os estádios mais avançados, pelo que deverão ser utilizados como alimento nesta fase. As diferenças em lípidos totais e em conteúdo calórico individual entre o *instar* I e II pode ascender a cerca de 27% de perda (Sorgeloos, 1980).

A temperaturas de 26-28°C a passagem de *instar* I a *instar* II dá-se em cerca de oito horas. Nesta fase, inicia a alimentação exógena composta por microalgas, bactérias e pequenas partículas variadas (1-50 µm), (Fig. 8).

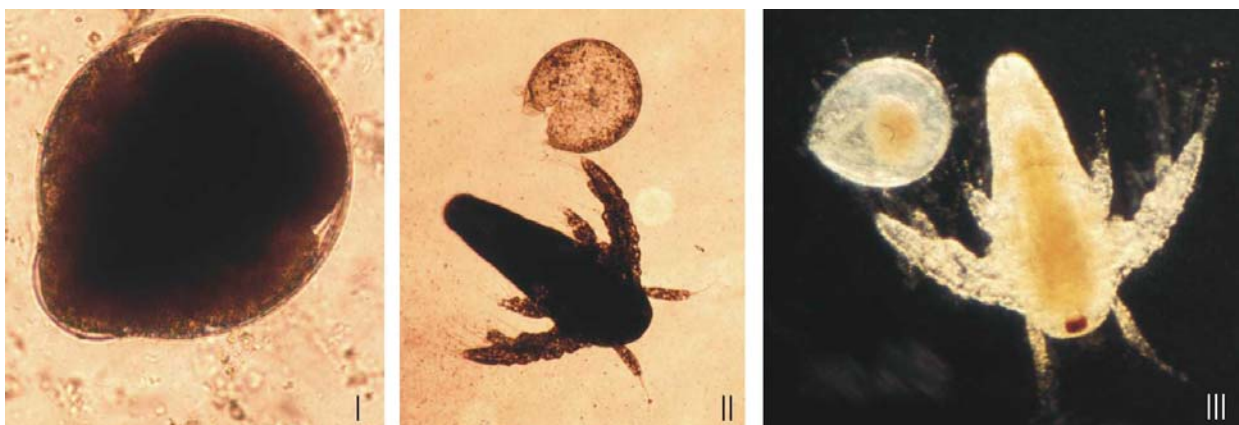


Figura 8 – Cisto e *Artemia* spp. recém eclodida.

Os cistos podem ser descapsulados (remoção do córion através da dissolução em hipoclorito de sódio) ou postos a eclodir directamente em água salobra ou salgada, de acordo com a preferência da estirpe utilizada, em tanques com a forma cilíndrico-cónica, transparentes ou translúcidos. Ambos os métodos podem ser utilizados de acordo com as infra-estruturas presentes.

A incubação dos cistos é uma fase importante de modo a assegurar uma máxima taxa de eclosão. Esta deverá ser feita sob as seguintes condições (Dhont & Stappen, 2003; Sorgeloos *et al.*, 1986):

- Temperatura entre 25-30 °C,
- Luz intensa, 2000 lux (mínimo de 1000 lux em pequenos volumes), durante todo o processo (24h-28h), ou no mínimo nas primeiras horas após a total hidratação dos cistos. A luz, nas primeiras 4 a 5 horas é de importância porque os cistos são sensíveis à luz que estimula o reinício do metabolismo e os primeiros estádios da eclosão,
- Salinidade 20 a 35. No entanto, de acordo com a espécie poderá situar-se entre 15 e 70 e com certas estirpes obtêm-se melhores resultados com valores inferiores, que podem atingir 5 de salinidade.
- O pH 8 ou acima deste valor, pode ser corrigido com ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{NaHCO}_3$  até 1g/l), principalmente em grandes densidades de incubação). O pH é fundamental porque a dissolução da membrana embrionária é despoletada pelo enzima da eclosão que tem o seu máximo de actividade para valores entre 8 e 9 (Narciso, 1987). Os metabólitos da eclosão fazem baixar o pH, o que pode levar à diminuição das taxas de eclosão (20-25%),
- Arejamento contínuo e forte, de forma a manter os cistos em suspensão e o  $\text{O}_2$  dissolvido acima de 5 mg/l, (mínimo 2mg/l). Neste arejamento normalmente não se utilizam pedras difusoras para evitar projecção dos cistos e náuplios para fora do recipiente e diminuir o contacto da bolhas com os náuplios, o que pode aumentar as taxas de mortalidade,
- Densidade máxima de cistos de 2 g.L<sup>-1</sup>.

## Descapsulação

A descapsulação consiste na remoção do córion dos cistos, por dissolução com hipoclorito. Este método correctamente utilizado não afecta a viabilidade dos embriões que se encontram protegidos pela membrana embrionária (Amat, 1985; Leger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002), (Fig.9), sendo vantajoso por:

- Desinfectar os cistos, libertando-os do suporte de infecções bacterianas, de substâncias tóxicas (pesticidas, metais pesados, e outros contaminantes) e de impurezas várias,
- Permitir uma mais fácil e rápida eclosão dos náuplios, com menores dimensões,
- Facilitar a eclosão, com menor gasto de energia de reserva (glicogénio) na dissolução do córion, apresentado maior qualidade nutritiva para as larvas dos peixes,
- Ausência de cascas e, conseqüentemente, menor tempo utilizado na colheita dos náuplios. A introdução de cascas nos tanques, além de ser um foco de poluição, é muito perigosa pois estas podem ser consumidas pelas larvas de peixes e, não sendo, digeríveis podem obstruir o intestino e provocar a morte ou provocar doenças infecciosas (Sorgeloos *et al.*, 1977).

Este método também pode ser desvantajoso se não se respeitarem rigorosamente as doses da solução descapsulante e o tempo de duração deste tratamento (em função da estirpe de *Artemia* spp.) assim como se não se controlar a temperatura da reacção. Uma má aplicação poderá inviabilizar total ou parcialmente os cistos.

Os cistos descapsulados não flutuam, uma vez que era no córion removido que existiam câmaras de ar que lhe davam flutuabilidade, pelo que a sua incubação deve ser feita com forte arejamento.

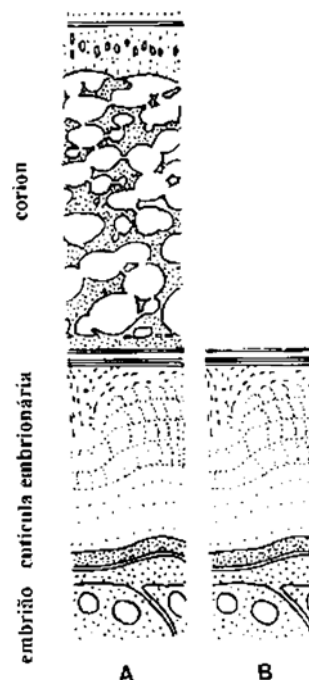


Figura 9 – Corte da casca de um cisto. A – não descapsulado; B – descapsulado. (Adaptado de Leger *et al* 1986).



O processo de descapsulação, consiste em (Fig.10):

1. Hidratar os cistos;
2. Tratar os cistos com solução de hipoclorito de sódio (Anexo I);
3. Lavar e neutralizar os resíduos de cloro.

Os cistos descapsulados podem ser utilizados de imediato ou ser desidratados para armazenamento.

A hidratação dos cistos é feita preferencialmente em água doce, a cerca de 25°C, durante 1 a 2 horas até apresentarem uma forma esférica. Deve ser feita num recipiente com abundante arejamento de modo a ser homogénea. Depois de hidratados os cistos são recolhidos e lavados numa rede de 125µm e concentrados para serem tratados com a solução descapsulante ou guardados por algumas horas no frigorífico (0-4°C).

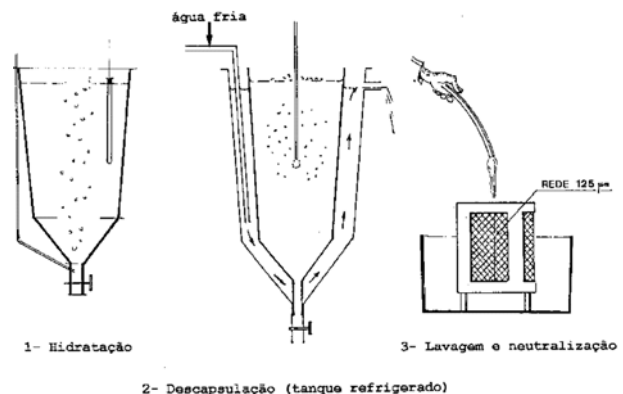


Figura 10 – Processo de descapsulação de *Artemia* spp. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

O tratamento dos cistos com hipoclorito de sódio ou lixívia comercial (Tabela I) pode ser feito utilizando a solução de descapsulação descrita em seguida, sendo um processo que dura cerca de 10 a 15 minutos.

A descapsulação deve ser feita em banho termostatisado, utilizando água fria e/ou gelo, de forma a manter a temperatura entre 15 e 20°C, porque a reacção que se dá durante o tratamento com hipoclorito é uma oxidação exotérmica podendo elevar a temperatura para níveis que inviabilizam os cistos (>40°C).

Durante este tratamento deve-se assegurar uma suspensão homogénea dos cistos através de agitação ou arejamento. Quando se inicia a reacção, o córion começa a dissolver-se, desenvolve-se espuma e os cistos mudam de cor para cinzento (ou castanho se utilizarmos  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) e finalmente para laranja. A descapsulação termina quando os cistos apresentam uma cor alaranjada. Nesta fase os cistos são transferidos para um filtro com rede de 125µm e abundantemente lavados em água salgada corrente para parar a reacção. De seguida, são mergulhados durante alguns instantes numa solução de ácido clorídrico a 0,3% (0,1N HCL - 3,7g/l) para neutralizar algum vestígio de hipoclorito ou de tiosulfato

de sódio em diluição correspondente à da lixívia utilizada. São lavados novamente e colocados num recipiente com água salgada para verificar se a descapsulação foi homogénea.

Os cistos que não foram completamente descapsulados, isto é, em que ficaram restos do córion, flutuam podendo ser retirados por transbordo. Podem ser desidratados e guardados para posterior descapsulação com outros. Os restantes são concentrados para utilizar de imediato ou guardados para utilização posterior.

Os cistos descapsulados, e após serem secos numa rede de 125µm, podem ser guardados por alguns dias no frigorífico ou secos numa solução de salmoura e guardados para utilização futura.

Tabela I - Actividade da solução de NaOCl (hipoclorito de sódio) de diferentes origens, determinada por densitómetro ou refratómetro .					
Gravidade específica <sup>a</sup> 15°C	Clorimetria <sup>b</sup> °	Actividade <sup>c</sup> %	Cloro g.L <sup>-1</sup>	Índice de refração <sup>d</sup>	
--					
--	10,0	3,21	32,2	1,3451	(66)
1,099	16,3	5,25	52,5	1,3518	(104)
1,116	20,4	6,56	65,6	1,3562	(129)
1,133	24,3	7,81	78,1	1,3604	(152)
1,151	28,6	9,19	91,9	1,3650	(175)
1,170	32,7	10,51	105,1	1,3694	(---)
1,189	37,7	12,12	121,2	--	
1,209	41,0	13,18	131,8	--	
1,220	46,8	15,04	150,4	--	
	50,5	16,23	162,3	--	

a) in Sorgeloos *et al.*, 1983. b) graus clorimétricos franceses = 3,111 x % actividade. c) graus clorimétricos ingleses = 0,3214 x ° clorimétrico. d) escala de fidelidade de 1,3740; para valores maiores diluir com água doce; entre parêntesis os valores de salinidade lidos no refractómetro; conversão do índice de refração lido (x) para concentração de produto activo em g.L<sup>-1</sup> (y) segundo a equação Y = 3000 X - 4003.

## Incubação directa

A incubação directa dos cistos (não descapsulados) (Fig.11) apresenta a vantagem de, por vezes, oferecer maior garantia de eclosão, pois não são invulgares os problemas causados por deficiente descapsulação (normalmente demasiado longa ou solução de hipoclorito demasiado forte).

Os cistos devem ser previamente desinfectados de modo a remover bactérias, fungos ou impurezas orgânicas das suas cascas e que podem

ser potencialmente patogénicos para as larvas. As populações de bactérias do género *Vibrio* sp. são as mais comuns nas soluções de incubação (Stappen, 1996; Sorgeloos *et al.*, 2001). A desinfeção pode ser feita numa solução de hipoclorito -  $50\text{g.L}^{-1}$  em água doce ou numa solução de  $\text{NaOCl}$  ou  $\text{Ca(OCl)}_2$ , mantidos em suspensão pelo arejamento, nas seguintes concentrações (Sorgeloos *et al.*, 1986):

- 200 ppm de cloro activo durante 20 minutos,
- 150 ppm de cloro activo durante 30 minutos,
- 20 ppm de cloro activo durante 90 minutos.

Após a desinfeção os cistos devem ser abundantemente lavados antes de serem postos a eclodir.

A incubação directa é utilizada desde que os tanques permitam uma fácil colheita dos cistos sem cascas misturadas. Normalmente esta fase é mais morosa e as densidades de cistos a incubar são menores ( $1$  a  $2\text{ g.L}^{-1}$  contra  $5\text{ g.L}^{-1}$  descapsulados).

A colheita de náuplios e a sua separação dos cistos é feita aproveitando geralmente o fototactismo positivo dos náuplios, do seguinte modo (Fig. 12):

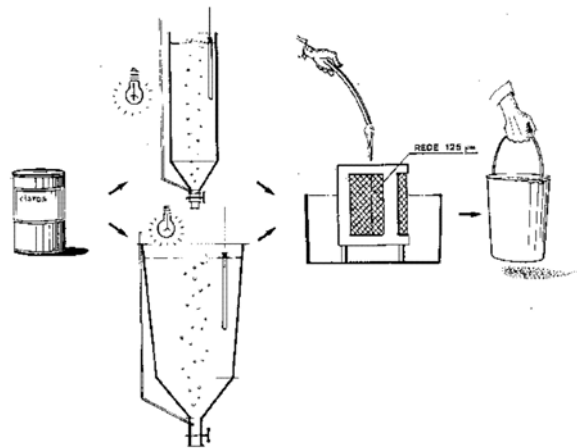


Figura 11 – Incubação directa dos cistos. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

1. Com o tanque iluminado no topo, o arejamento é parado durante 10 a 15 minutos, fazendo-se uma purga pelo fundo de forma a remover os decantados. Este processo é repetido as vezes necessárias. As cascas (ou córion) vazias flutuam, permanecendo na superfície.

2. Com a sala na escuridão, ilumina-se o tanque no fundo. Passado alguns minutos os náuplios estão concentrados nesta zona (devido ao seu fototactismo positivo) e são retirados pela torneira de purga do fundo, separados das cascas que flutuam. A água utilizada na incubação deve ser salgada (35 de salinidade) de modo a permitir uma melhor flutuação das cascas vazias e a sua fácil separação dos náuplios. Por vezes, sobe-se a salinidade até 50, o que permite uma maior flutuabilidade das cascas vazias sem afectar os náuplios (De los Santos *et al.*, 1980 *in* Versichelle *et al.*, 1986).

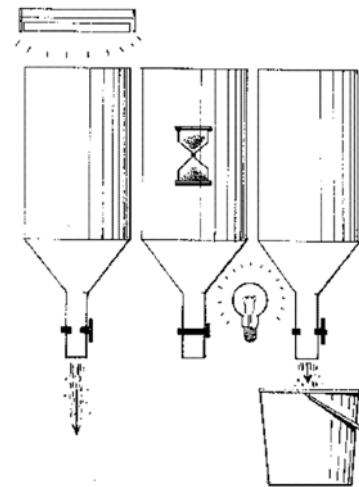


Figura 12 – Separação das cascas e náuplios recém eclodidos. (Desenho de J.J.Sá e Silva).

Quando a eclosão não é sincronizada, o processo anterior pode ser repetido por diversas vezes para se recolherem os náuplios à medida que vão eclodindo.

O acondicionamento das embalagens de cistos depois de abertas deve ser feita com especial cuidado, em ambiente seco e fresco, de preferência num saco escuro fechado sem ar, para evitar que a taxa de eclosão diminua significativamente

### Utilização de náuplios recém-eclodidos

Os náuplios recém eclodidos (Fig. 13), que devem ser utilizados o mais cedo possível após a eclosão quando o seu valor energético é maior, são recolhidos num filtro de malhagem de 125  $\mu\text{m}$  sendo abundantemente lavados para retirar produtos do metabolismo, glicerol e bactérias, e são concentrados em água doce ou salgada. Podem ser utilizados directamente ou bioencapsulados quando as larvas podem ingerir presas de maiores dimensões.

A utilização de náuplios, de pequenas dimensões ao longo do dia, pode ser feita com diferentes horas de incubação (Fig. 14) ou mantendo-os num recipiente com arejamento, a uma temperatura entre 4 e 10°C (usando termo-acumuladores). Deste modo, evita-se o seu crescimento sem perda significativa de conteúdo energético e valor nutritivo.

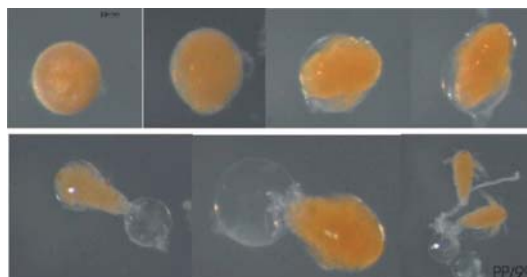


Figura 13 – Eclosão de cistos descapsulados de *Artemia* spp.

## Bioencapsulação

A bioencapsulação (ou enriquecimento) é utilizada de forma a enriquecer do ponto de vista nutritivo *Artemia* spp. (*instar* II e III), (Fig.15) de forma a fornecer um alimento equilibrado às larvas. É de primordial importância

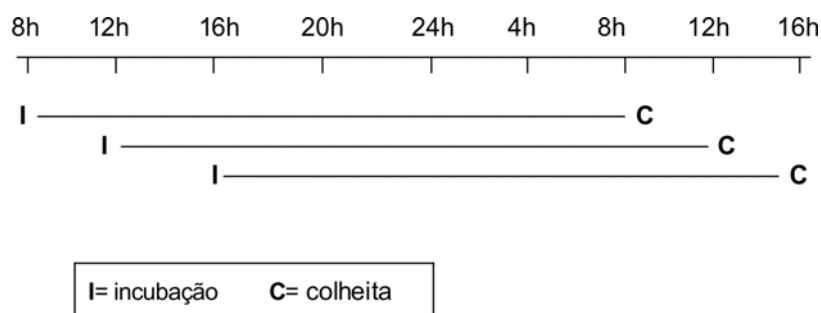


Figura 14 – Incubação de cistos e colheita de náuplios em horas desfasadas.

para as larvas de peixes marinhos o perfil em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (20:5n-3 - EPA e 22:6n-3 - DHA) e a relação DHA/EPA. Mais recentemente também se constatou que 20:4n-6 – ARA - é importante para o crescimento e pigmentação de várias espécies de peixes marinhos fornecendo percursos para os eicosanoides. (Dhont & Stappen, 2003; Sorgeloos *et al.*, 2001; Villalta *et al.*, 2005).

Neste sentido, utilizam-se microalgas, emulsões comerciais ou preparados em laboratório, ricos naqueles lípidos, de forma a se obterem os perfis desejados para as espécies em cultura. (Barclay & Zeller, 1996; Faulk & Holt, 2005; Hanaee *et al.*, 2005; McEvoy *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 2000; Pousão-Ferreira *et al.*, 1996; Robin, 1995; Stottrup & Attramadal, 1992; Southgate *et al.*, 1995; Woods, 2003).

No entanto, devido à sua cada vez mais completa composição bioquímica, que incluem vitaminas e bacteriostáticos, as emulsões comerciais são as mais utilizadas nas maternidades (Sorgeloos *et al.*, 2001).

As estirpes utilizadas para bioencapsular são normalmente as de mais baixo custo, dentro das que apresentam uma melhor eficiência de eclosão (acima de 200 000 náuplios.g<sup>-1</sup> de cistos) e um melhor sincronismo de eclosão (menos de 7 h de diferença entre a eclosão do primeiro e último náuplio), (Sorgeloos *et al.*, 2001).

Após a eclosão os náuplios são recolhidos, separados de detritos, lavados e colocados num tanque com água salgada e arejamento ao qual se junta o produto de bioencapsulação.

A concentração de náuplios deve estar de acordo com as instruções do fabricante.

Este enriquecimento deve ser feito logo que as larvas podem ingerir *Artemia spp.* de maiores dimensões (metanáuplios), por o seu valor nutritivo poder ser substancialmente melhorado. O tempo de enriquecimento varia de acordo com o produto utilizado e com a dimensão de *Artemia spp.* que se pretende obter.

Por outro lado, a quantidade de alimento no meio (partículas disponíveis.mL<sup>-1</sup>) parece ter uma influência directa na quantidade de alimento ingerido ao fim de determinado período de tempo. Animais de menores dimensões enchem mais rapidamente o tubo digestivo com menor concentração de partículas (Gelabert, 2003). Desta forma, a quantidade a utilizar de uma emulsão ou a sua disponibilidade ao longo do período de enriquecimento também poderá afectar o perfil final em ácidos gordos. Este perfil poderá apresentar o mesmo resultado relativo (em %) mas poderá ser diferente em valores absolutos (mg.g<sup>-1</sup>) de determinado ácido gordo ou grupo de ácidos gordos, fornecido às larvas.

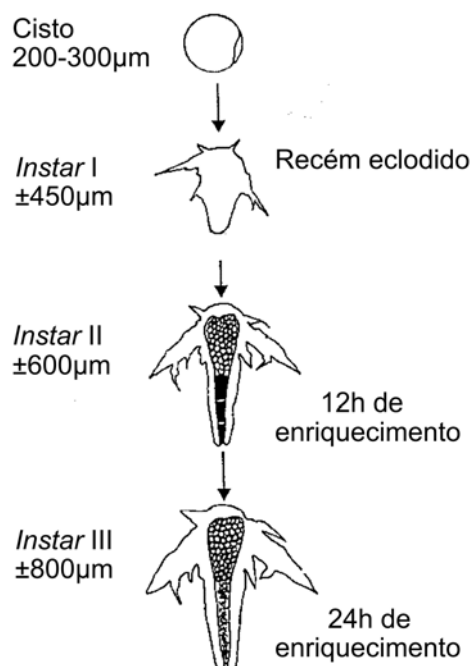


Figura 15 – Bioencapsulação. (Adaptado de Artemia Systems®).

O perfil final em ácidos gordos vai depender da composição do produto utilizado, da sua disponibilidade e do tempo de bioencapsulação (Han *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 1997).

O perfil nutritivo de *Artemia* spp., considerado atrás, é logo após a bioencapsulação. Se permanecerem nos tanques larvares demasiado tempo sem serem consumidas e sem se alimentarem o seu perfil lipídico vai diminuir significativamente. Ensaios de inanição de *Artemia* spp. apresentados mais adiante neste trabalho e efectuado por outros autores (Evjemo *et al.*, 2001; Ritar, *et al.*, 2004) mostram claramente a diminuição do perfil em ácidos gordos de *Artemia* spp. em função do tempo de inanição. Verifica-se também que *Artemia* spp. tem capacidade de retroconverter DHA acumulado durante o período de enriquecimento em EPA quando submetida a inanição (Navarro *et al.*, 1999). Este catabolismo de DHA leva a uma diminuição da relação DHA/EPA, fundamental para os peixes marinhos.

Este tipo de resultados implica uma boa definição da estratégia de fornecimento de *Artemia* spp. às larvas de modo a manter o perfil nutritivo das presas.

Um dos problemas associados ao cultivo e à bioencapsulação de *Artemia* spp. é o desenvolvimento de populações de bactérias (ex: *Vibrio* spp.) que são patogénicas para a *Artemia* spp. provocando importante mortalidade (Ritar, *et al.*, 2004). Neste sentido, procuram-se soluções, como a utilização de determinadas espécies de microalgas, probióticos ou imunoestimulantes (como bactérias patogénicas mortas) no sentido de proteger *Artemia* spp (Marques *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2006). *Artemia* spp. também pode ser bioencapsulada com imunoestimulantes com vista a proteger as larvas contra bactérias patogénicas (ex: *Vibrio* spp.) contribuindo para uma melhor sobrevivência larvar (Skjermoa & Bergh, 2004).

Por outro lado, estas bactérias ao serem introduzidas juntamente com as presas nos tanques larvares poderão também vir a provocar mortalidade nas larvas.

Normalmente utiliza-se *Artemia* spp. com 12h, 24h, 36h e 48h de vida, de acordo com a dimensão que se pretende, fazendo-se o crescimento e enriquecimento com um produto de alto valor nutritivo (Fig.16). Neste caso, maior dimensão corresponde a maior valor nutritivo. Por vezes utiliza-se um produto de mais baixo custo como a levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) e posteriormente a bioencapsulação.

Este método é, no entanto, menos aconselhado devido ao baixo valor nutritivo da levedura, *Artemia* spp. cresce pior que com microalgas (Marques *et al.*, 2004), e poderá trazer problemas

nutritivos para as larvas, se o período posterior de bioencapsulação não for suficiente.

*Artemia* spp. após o enriquecimento é filtrada, e concentrada. Deve ser abundantemente lavada com água salgada filtrada e esterilizada para retirar os restos de gordura dos produtos de enriquecimento (de preferência com água a 26-28 °C para facilitar a remoção da gordura) diminuir a carga bacteriana e retirar produtos resultantes do metabolismo (Fig. 17). Esta tarefa exige algum cuidado e demora algum tempo pelo que se encontram em desenvolvimento equipamentos que permitem rentabilizar esta operação (Fig 18), (Wu & Chu, 2007).

A utilização, logo que seja possível, de náuplios de maiores dimensões (Fig.19), com maior peso individual, é benéfica por permitir às larvas alimentarem-se com um menor número



Figura 17 - Lavagem de *Artemia* spp.

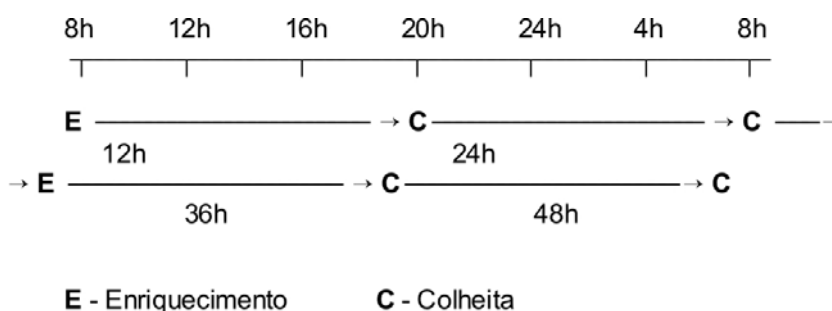
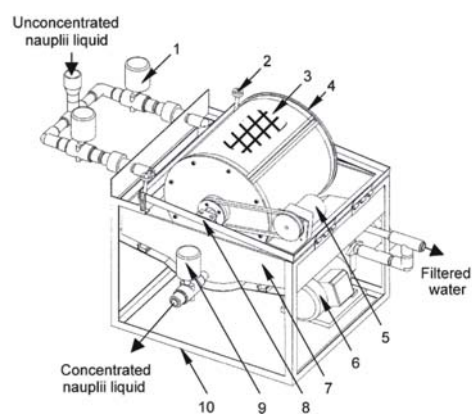


Figura 16 – Enriquecimento de *Artemia* spp. com diferentes horas de crescimento.



The rotating drum *Artemia* nauplii concentrator. (1) Inflow control valve, (2) level adjusting wheel, (3) plankton screen, (4) rotating drum, (5) driving motor, (6) pump, (7) container, (8) swing pane, (9) drain control valve and (10) frame.

Figura 18 – Equipamento, tipo filtro de tambor rotativo, para lavar e concentrar náuplios de *Artemia* spp. (in Wu & Chu, 2007.)



presas, despendendo menos energia na sua captura (Sorgeloos *et al.*, 1983).

### Utilização de lipossomas

A utilização de lipossomas (vesículas artificiais lipídicas que permitem encapsular produtos no seu interior) poderá vir a ser outra forma de encapsular ácidos gordos em *Artemia* spp. e garantir a sua transferência para as larvas. Diversos tipos de lipossomas têm vindo a ser desenvolvidos com o objectivo de melhorar a sua formulação, composição da sua membrana, tipo de vesícula e metodologia da sua preparação e tipo de produto a encapsular tendo em vista o enriquecimento de náuplios *Artemia* spp. para fornecer a larvas de robalo (Monroig *et al.*, 2003).

Ensaio realizados por Monroig *et al.* (2006a), bioencapsulando com lipossomas *Artemia* spp. para alimentar larvas de dourada, constataram variação no perfil em ácidos gordos das larvas embora não encontrando diferenças em relação à sobrevivência e ao crescimento. Os resultados obtidos apontam no sentido de dietas baseadas em lipossomas poderem a vir úteis na alimentação das larvas (permitindo encapsular diferentes produtos ou nutrientes), existindo um campo para aperfeiçoamento quer dos lipossomas quer das metodologias de enriquecimento de *Artemia* spp. A densidade de *Artemia* spp. a enriquecer, as doses e quantidade de lipossomas a fornecer obedecem a protocolos tal como com as emulsões comerciais (Monroig *et al.*, 2006b).

Quando se utilizam adultos de *Artemia* spp. selvagem recolhida em salinas, esta deverá ser bioencapsulada após a colheita. Tem geralmente baixo valor nutritivo para as larvas pelo que, deverá ser previamente alimentada com uma emulsão adequada. *Artemia* spp. de maiores dimensões apresenta a vantagem de conter um maior valor proteico ( $\approx 60\%$ ).

Por outro lado, para evitar problemas patológicos por introdução de agentes patogénicos (bactérias ou parasitas) nos tanques deve ser congelada. Este processo



Figura 19 – Náuplio de *Artemia* spp. com 36h após a eclosão.

deve ser feito com especial cuidado de modo a não se destruir o seu exoesqueleto conservando o animal inteiro.

Deve ser congelada por camadas de 1cm (Sorgeloos *et al.*, 1986), podendo-se utilizar as "cuvettes" normalmente utilizadas para fazer cubos de gelo.

Para a produção de biomassa de *Artemia* spp. (com exemplares adultos) existem sistema de recirculação em desenvolvimento que apresentam resultados promissores (Zmora & Shpigel, 2006).

Como se referiu *Artemia* spp., através da bioencapsulação permite "transportar" para as larvas o perfil nutritivo dos produtos utilizados, assim como vitaminas, antibióticos e outros elementos que possam ser encapsulados e que tenham dimensão para serem ingeridos (Figs. 20 e 21).

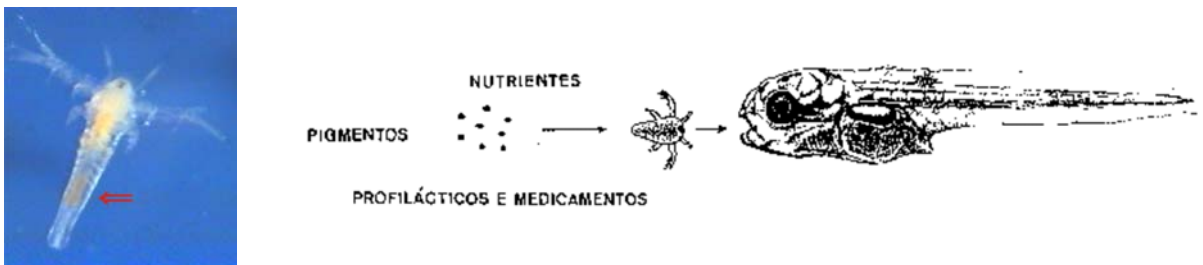


Figura 20 – *Artemia* spp. Figura 21 – Utilização de *Artemia* spp. (Adaptado de Sorgeloos *et al.*, 1987). bioencapsulada.

## Tanques e equipamentos

A produção de *Artemia* spp. é feita em sala própria, climatizada de modo a minimizar as perdas de energia devido a toda a produção ser efectuada a temperaturas entre 24-28 °C, e a evitar contaminações das outras áreas de produção da cadeia alimentar.

A dimensão e o número de tanques a utilizar dependem da produção diária pretendida. Assim, podem ser utilizados tanques de 250 a 2000 litros, cilíndrico-cónicos de modo a manter mais facilmente, através do arejamento, cistos e náuplios em suspensão. Devem ser transparentes ou translúcidos o que além de baixar o seu preço permite uma melhor entrada de luz, factor importante quer para a eclosão quer para a separação dos náuplios das cascas. Os tanques a utilizar são, normalmente, destinados a:

- a) Descapsulação,
- b) Incubação,
- c) Crescimento.



Figura 22 - Tanques de eclosão de *Artemia* spp.



Figura 23 – Tanques de bioencapsulação de *Artemia* spp.

O volume e número de cada item, deverão estar de acordo com as necessidades (número de larvas que se pretende produzir e quantidade de *Artemia spp.* necessária por dia) e com o método de produção e utilização (Figs. 22 e 23).

O tanque apresentado na figura 22 pode ser utilizado para a eclosão dos cistos (descapsulados ou não). Tapando a superfície de modo a escurecer o seu interior, os cistos podem ser atraídos e concentrados, devido ao seu fototactismo, para junto da vigia utilizando uma fonte de luz. Como esta se encontra próxima da válvula de fundo podem ser colhidos e separados das cascas que flutuam (como descrito atrás).

Para a eclosão poderão também ser utilizados sacos de manga plástica semelhantes aos que se usam para a produção de microalgas, nas condições descritas para a incubação dos cistos.

Os equipamentos específicos para este cultivo são os filtros em PVC para colheita e lavagem, de rede de nylon (rede para plâncton) com malhagem entre 125 $\mu$ m e 500 $\mu$ m conforme a dimensão dos náuplios.

A água salgada que abastece este sector deve ser filtrada até 1 $\mu$ m, esterilizada por radiação ultravioleta e aquecida, conforme já referido para os rotíferos (Fig.24).



Figura 24 – Sistema de filtração e aquecimento de local água.

## Utilização de *Artemia* spp. em aquacultura

*Artemia* spp. é utilizada em diversas fase do seu crescimento, desde recém-eclodida até 2 ou 3 dias de idade, de acordo com a dimensão das larvas (tamanho da boca) e a sua capacidade para as ingerirem (Fig, 25).

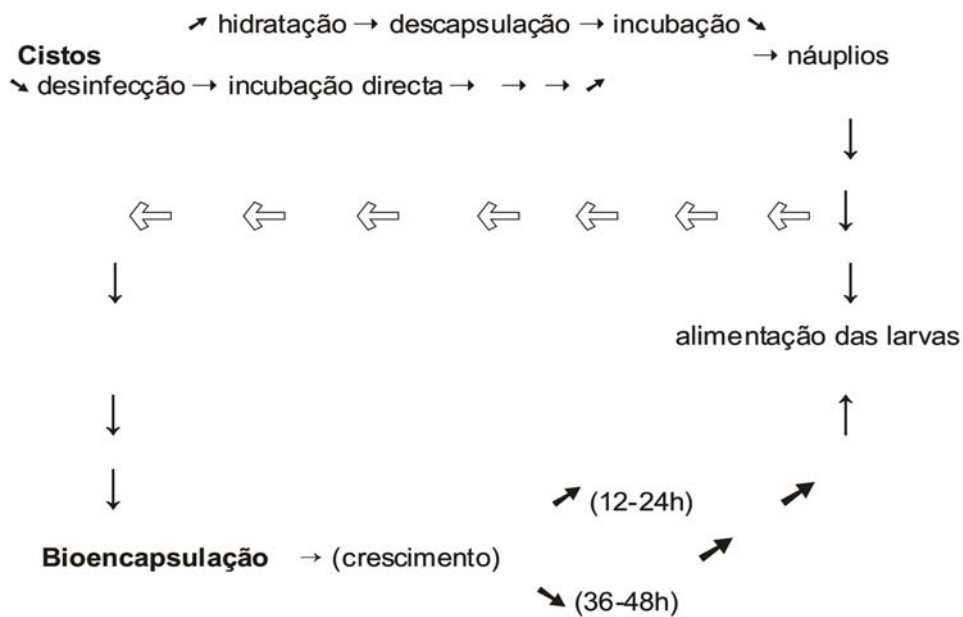


Figura 25 – Plano de utilização de *Artemia* spp.

### Estirpes com maior valor nutritivo

A utilização de náuplios recém-eclodidos e nas suas diversas fases de crescimento depende da possibilidade de serem ingeridas pelas larvas dos peixes. Existe deste modo um plano alimentar para cada espécie em função da dimensão da larva, que por sua vez, para a mesma espécie, depende essencialmente da temperatura da água de cultivo. Na maioria das espécies com que trabalhamos o cultivo faz-se a  $19^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , pelo que existe uma idade previsível para a introdução de *Artemia* spp. nos tanques. No entanto, esta introdução é feita inicialmente em pequenas quantidades e corrigida de acordo com a observação da sua ingestão pelas larvas, visto que *Artemia* spp. não consumida vai crescer e constituir um foco de poluição no meio.

Os primeiros estádios de náuplios de *Artemia spp.* não se alimentam pelo que nas primeiras horas de vida não é possível alterar o seu perfil nutritivo. A escolha da estirpe a utilizar é feita no sentido de se utilizarem as que dão origem a náuplios de menores dimensões (Fig. 26) e que apresentem um perfil lipídico o mais adequado possível às necessidades das larvas.

Por esta razão utilizamos, como se referiu atrás, as estirpes mais pequenas e com melhor perfil nos principais ácidos gordos para larvas dos peixes marinhos para fornecer recém-eclodida e outras estirpes de maior dimensão à eclosão e menor valor em ácidos gordos para bioencapsular e fornecer numa fase mais avançada do cultivo larvar. Por uma questão prática passaremos a designar por estirpe M (marinha) e estirpe C (continental), respectivamente as primeiras e as segundas.

A selecção da estirpe a utilizar e a sua gestão ao longo do período de cultivo larvar é deste modo fundamental de forma a garantir que as larvas possam ingerir *Artemia spp.* o mais cedo possível (evitando ou diminuindo o consumo de rotíferos, conforme a espécie de peixe cultivada), através de estirpes marinhas (M) com melhor perfil nos principais ácidos gordos e em HUFA (Figs. 27 e 28). Como se referiu, devido ao elevado custo destes cistos estas estirpes apenas se utilizam enquanto não é possível fornecer estádios larvares de *Artemia spp.* mais avançados, mas de maiores dimensões, que já se alimentando torna possível a manipulação do seu perfil nutritivo. Deste modo, utilizam-se as estirpes C (continental).

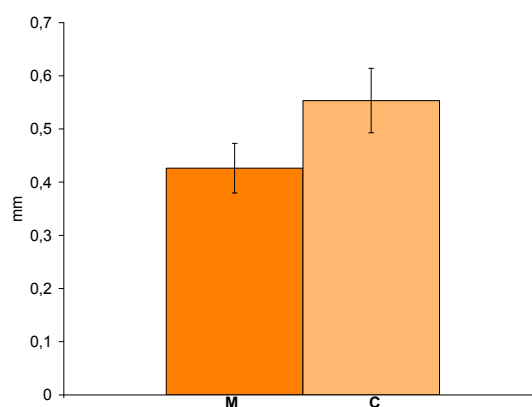


Figura 26 – Comprimento à eclosão de *Artemia spp.* das estirpes M (marinha) e C (continental).

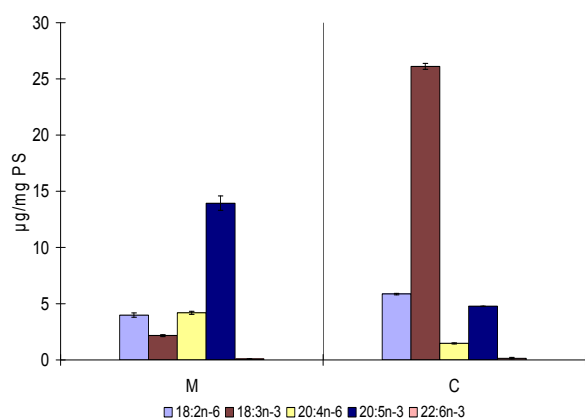


Figura 27 - Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* estirpes M (marinha) e C (continental).

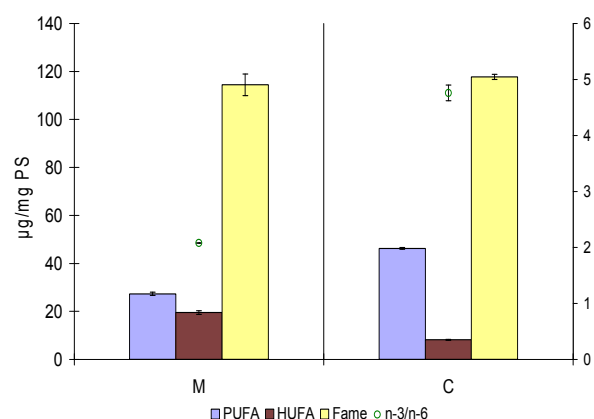


Figura 28 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 de *Artemia spp.* estirpes M (marinha) e C (continental).

A gestão da utilização destes náuplios ao longo do dia constitui outro factor importante de modo a não permitir o seu crescimento e minimizar as perdas de valor nutritivo até serem consumidos pelas larvas. Deste modo é muito importante gerir a sua produção de forma a se terem sempre ao longo de todo o dia náuplios com as menores dimensões e o melhor perfil lipídico possíveis, o que poderá ser feito de dois modos:

1- Os cistos são postos a incubar a diferentes horas de véspera de forma a se terem cistos eclodidos a diferentes horas do dia. Este método além de acarretar um significativo aumento de trabalho e de meios poderá não corresponder ao consumo pelas larvas ou de se correr o risco de excesso de náuplios e desperdício dos mesmos. No entanto, conseguem-se os dois objectivos de manter a dimensão adequada e o perfil lipídico.

2- Os náuplios são conservados a baixa temperatura ao longo do dia. Este método é o geralmente utilizado nas maternidades e apresenta bons resultados no aspecto de evitar o crescimento dos náuplios (Fig. 29)

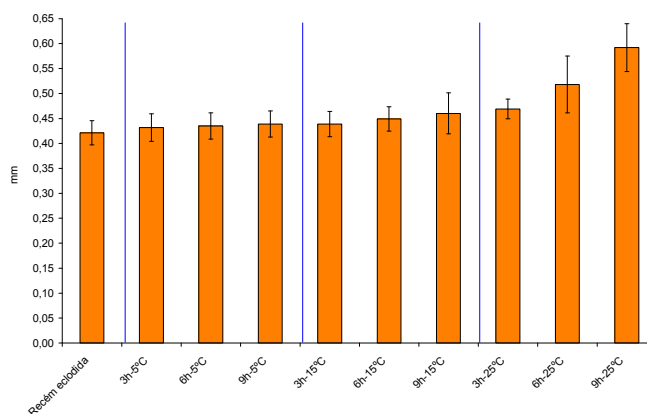


Figura 29 – Crescimento de náuplios de *Artemia spp.* estirpe M recém eclodida e após várias horas em água a diferentes temperaturas.



mas o mesmo já não se passa em relação à manutenção do perfil lipídico. Aqui pode observar-se que quer em valor absoluto ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco da amostra) (Figs. 30 e 31), quer em valor relativo (% dos ácidos gordos no peso seco das amostras), (Figs. 32 e 33), os valores dos principais ácidos gordos e dos grupos de ácidos gordos não apresentam grandes diferenças para os vários tempos de enriquecimento (3h, 6h e 9h) a diferentes temperaturas ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ).

Deste modo, este método apenas tem vantagem para a conservação da dimensão dos náuplios.

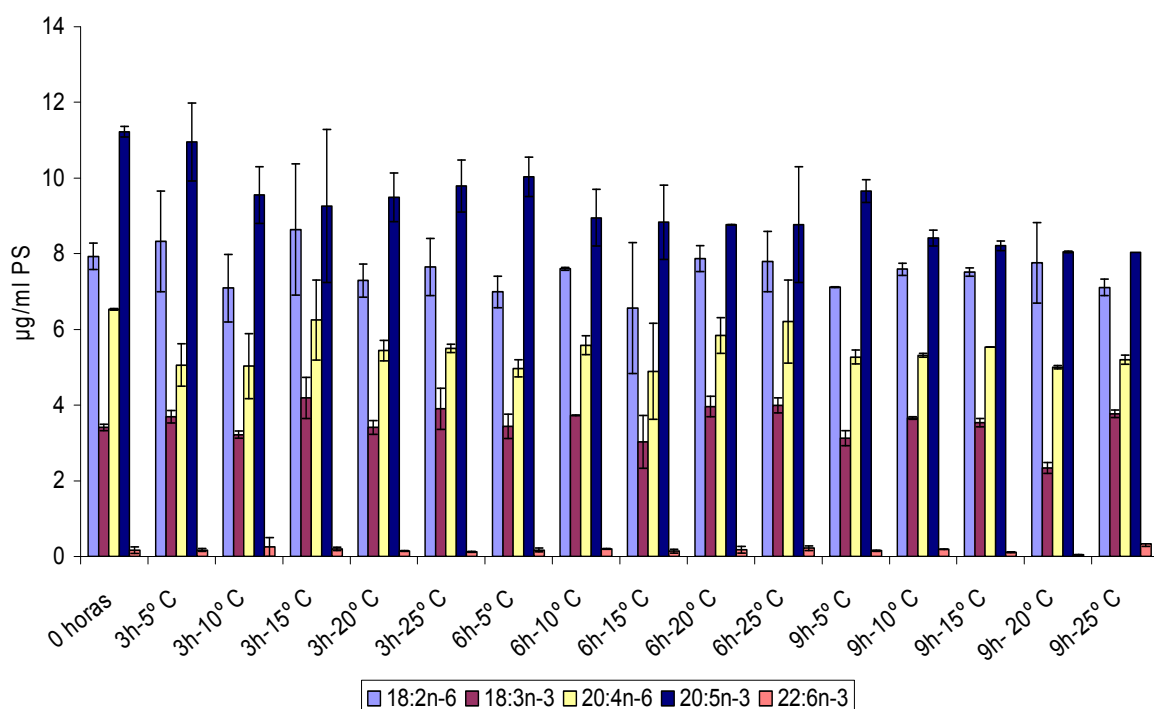


Figura 30 - Perfil dos ácidos gordos (expressos em massa) importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* estirpe M (marinha) recém eclodida e após várias horas em água a diferentes temperaturas.



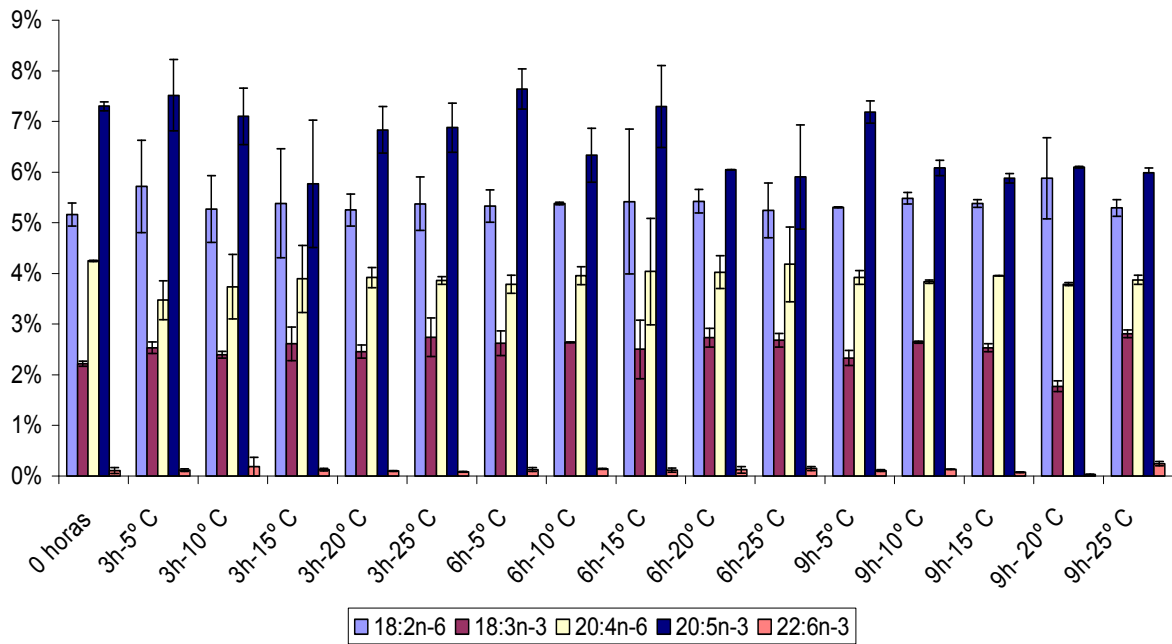


Figura 31 - Perfil nos ácidos gordos (expressos em percentagem) importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. estirpes M (marinha) recém eclodida e após várias horas em água a diferentes temperaturas.

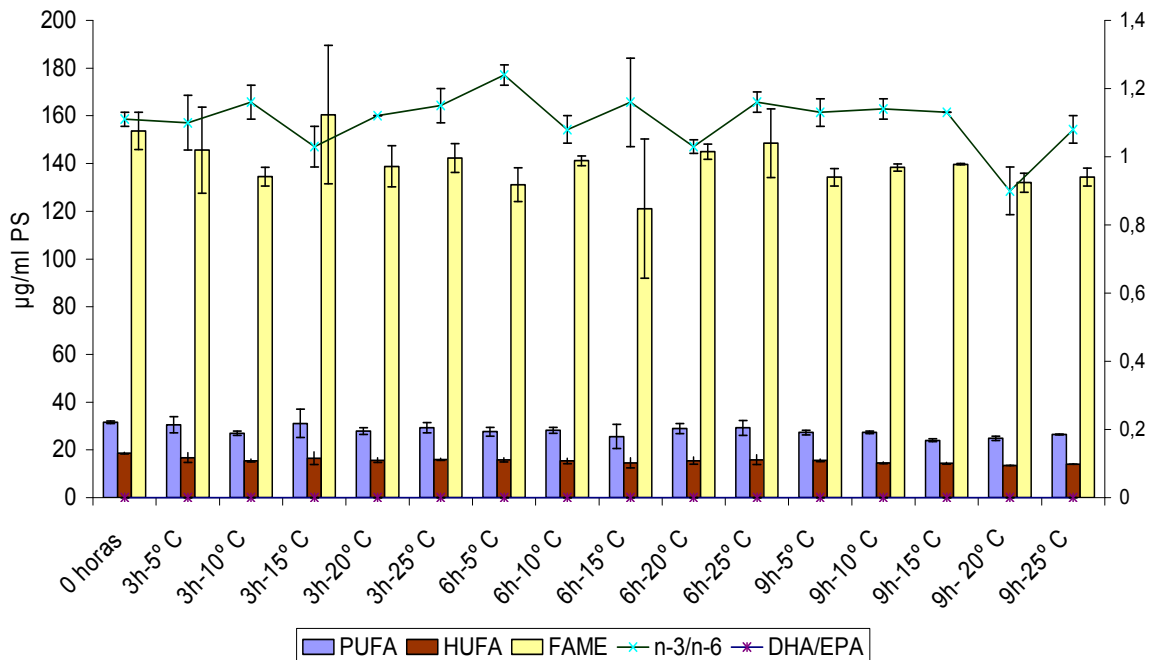


Figura 32 - Perfil nos grupos de ácidos gordos (expressos em massa) importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. estirpe M (marinha) recém eclodida e após várias horas em água a diferentes temperaturas.

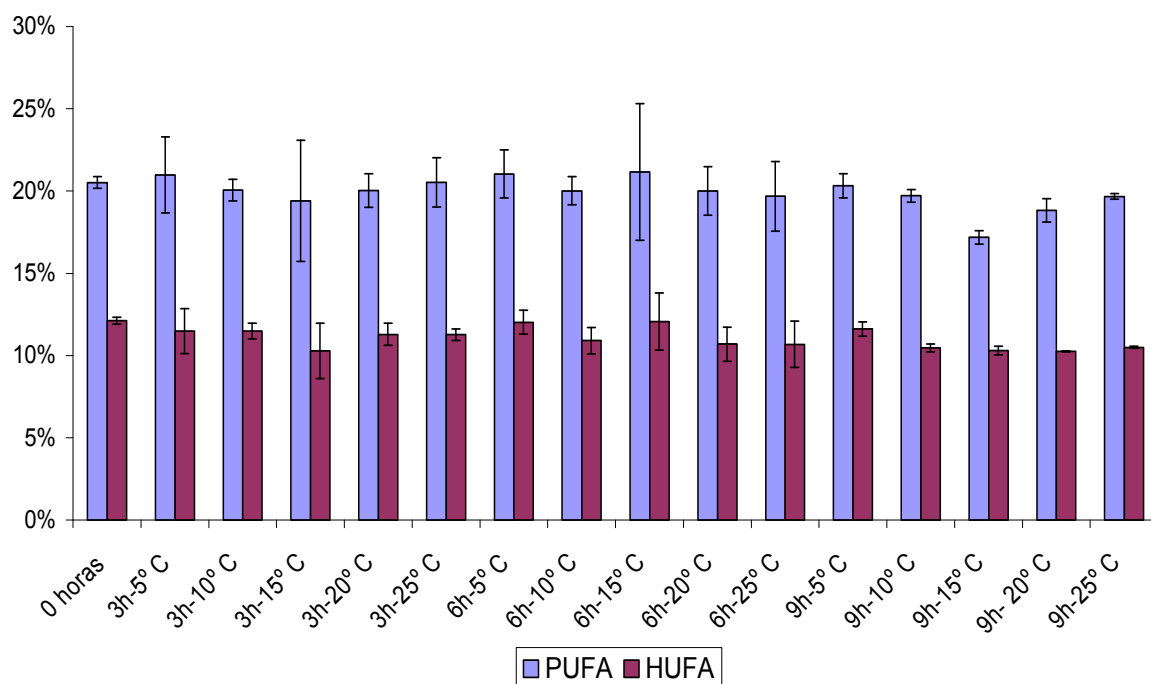


Figura 33 - Perfil em PUFA e em HUFA (expressos em percentagem) de *Artemia spp.* estirpe M (marinha) recém eclodida e após várias horas em água a diferentes temperaturas.

### Estirpes com menor valor nutritivo

Como se referiu utilizam-se estas estirpes, que denominamos por C (continental), numa fase do cultivo larvar em que as larvas dos peixes já têm dimensão para ingerir presas de maior calibre. Neste caso, vamos utilizar os náuplios numa fase em que já se alimentando é possível, através da sua bioencapsulação (enriquecimento), alterar o seu perfil nutritivo, nomeadamente nos indispensáveis ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA). Nestes náuplios em crescimento poderemos alterar substancialmente o seu conteúdo em HUFA ao longo do tempo de alimentação. No entanto, a sua dimensão também vai aumentando (Fig. 34) pelo que teremos de enquadrar a sua utilização (tempo de bioencapsulação) de acordo com a possibilidade de serem posteriormente ingeridos pelas larvas.

Como se referiu utilizam-se estas estirpes, que denominamos por C (continental), numa fase do cultivo larvar em que as larvas dos peixes já têm dimensão para ingerir presas de maior calibre. Neste caso, vamos utilizar os náuplios numa fase em que já se alimentando é possível, através da sua bioencapsulação (enriquecimento), alterar o seu perfil nutritivo, nomeadamente nos indispensáveis ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA). Nestes náuplios em crescimento poderemos alterar substancialmente o seu conteúdo em HUFA ao longo do tempo de alimentação. No entanto, a sua dimensão também vai aumentando (Fig. 34) pelo que

teremos de enquadrar a sua utilização (tempo de bioencapsulação) de acordo com a possibilidade de serem posteriormente ingeridos pelas larvas.

De qualquer modo, como existem sempre diferentes dimensões de larvas nos tanques, a utilização dos diferentes estados de náuplios de *Artemia* spp. é feito em sobreposição com a gradual introdução de náuplios de maiores dimensões e com a gradual redução dos de menores dimensões. Esta operação é sempre controlada com a observação da larvas para verificar se estão a consumir os náuplios. Observa-se à lupa, uma hora após ao fornecimento dos náuplios e regista-se qual a percentagem de larvas que os ingerem. Por outro lado, retiram-se amostras de água do tanque para aferir o número de náuplios existentes permitindo deste modo corrigir o seu fornecimento aos tanques.

Os náuplios de *Artemia* spp. são pouco selectivos do ponto de vista alimentar, excepto quanto à dimensão das partículas, possibilitando assim a sua alimentação com produtos preparados com vista a alterarem o seu perfil nutritivo de acordo com as necessidades das larvas dos peixes. A este processo chamamos bioencapsulação e nele são utilizados produtos comerciais ou emulsões preparadas em laboratório no sentido de tentarmos aproximar o conteúdo lipídico dos náuplios

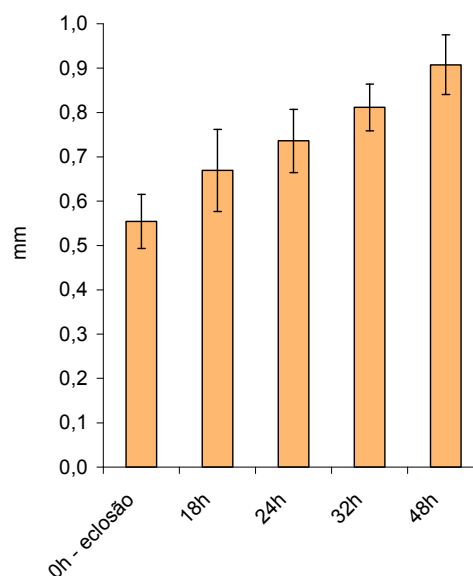


Figura 34 – Comprimento de náuplios de *Artemia* spp. estirpe C recém eclodida e após várias horas de crescimento a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

às necessidades das larvas e/ou de incorporarmos nas larvas outros elementos como antibióticos e vitaminas.

Como tem sido descrito por inúmeros autores o conteúdo das presas em ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa (HUFA) é directamente transferido para as larvas de peixes marinhos.

### - Perfil dos principais ácidos gordos e grupos de ácidos gordos de *Artemia* spp. em inanição.

Como se referiu é necessário bioencapsular *Artemia* spp. porque de outro modo vai consumir as suas reservas e o seu perfil em ácidos gordos diminuir como se pode observar nas figuras 35 e 36 e porque de qualquer forma não contém DHA. Estas referem-se ao crescimento de náuplios durante 33h em água salgada a 25°C, sem qualquer alimento. Verifica-se uma clara diminuição dos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, dos respectivos grupos de ácidos gordos e da relação n-3/n-6.

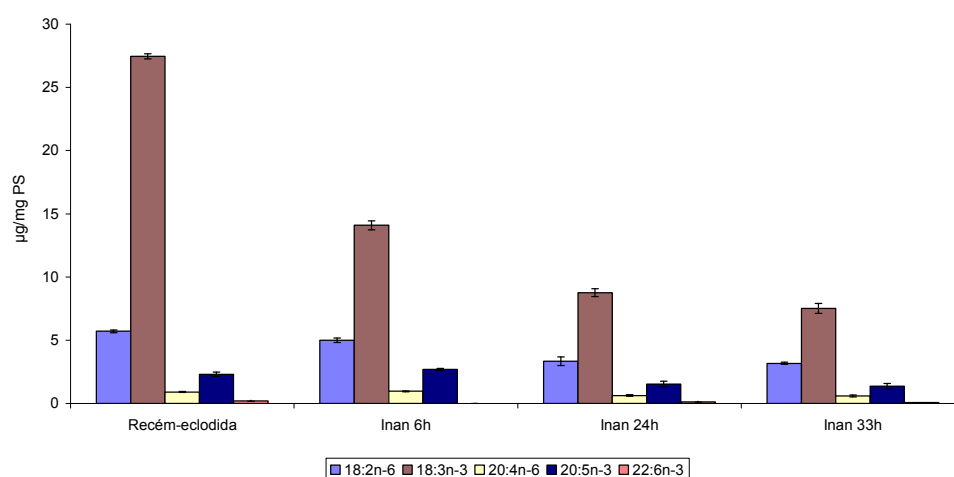


Figura 35 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. estirpe C recém-eclodida e em inanição durante 6h, 24h e 33h.

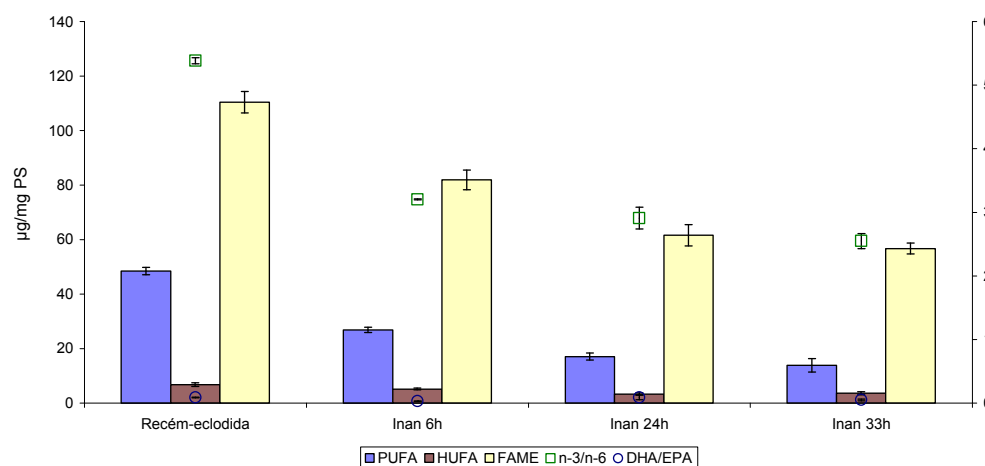


Figura 36 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. estirpe C recém-eclodida e em inanição durante 6h, 24h e 33h.

### - Bioencapsulação de *Artemia* spp. com diferentes microalgas.

Considerando a necessidade de enriquecer náuplios, foram efectuados ensaios de bioencapsulação de *Artemia* spp., estirpe C, com a microalga *Isochrysis aff. galbana* (*T-Iso*). Os ensaios foram efectuados com uma densidade de 250 art.mL<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25°C (de modo a ser compatível com a microalga), durante 9h, 24h, 33h e 48h. A duração dos ensaios teve em conta por um lado a dimensão de *Artemia* spp. que se pretende obter, por outro o seu perfil em ácidos gordos. Apresenta-se conjuntamente o perfil de náuplios recém eclodidos como ponto de partida para comparar o efeito da bioencapsulação. Nas Figuras 37 e 38 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento do DHA (22:6n-3). Este ácido gordo aumenta logo substancialmente ao fim de 9h de enriquecimento.

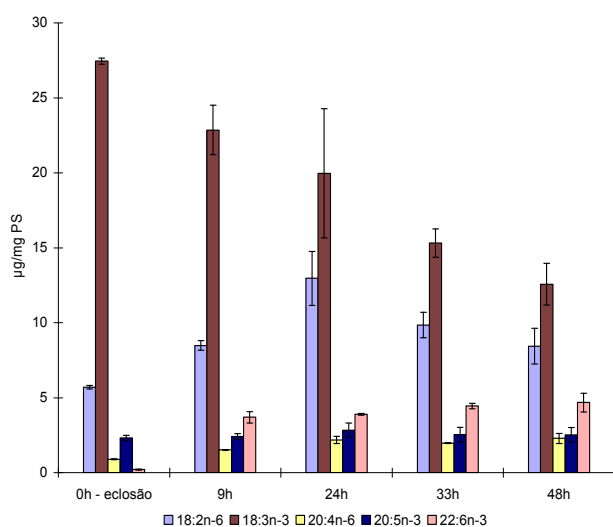


Figura 37 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com *Isochrysis aff. galbana* (*T-Iso*) durante quatro períodos de tempo.

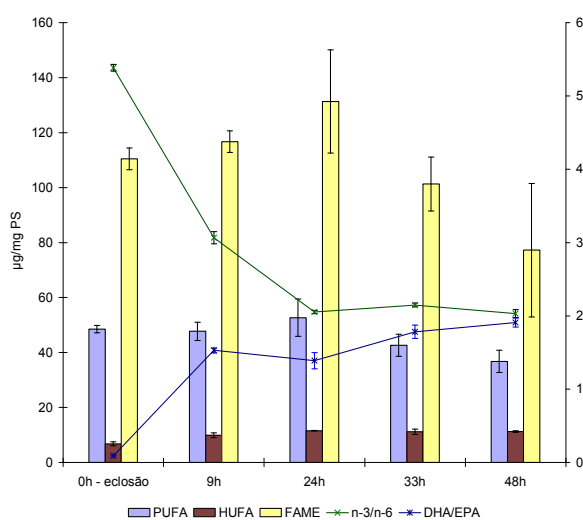


Figura 38 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com *Isochrysis aff. galbana* (*T-Iso*) durante quatro períodos de tempo.

Foram efectuados o mesmo tipo de ensaios, com uma mistura de 50% de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis aff. galbana* (*T-Iso*). As condições de cultivo,

foram as mesmas dos anteriores tendo-se observado que os resultados obtidos reflectem o perfil em ácidos gordos da mistura de microalgas utilizadas. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento de EPA (20:5n3) e de DHA (22:6n-3) embora neste caso menos que no enriquecimento apenas com *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)*. Verifica-se também uma diminuição na relação DHA/EPA, devido ao aumento do perfil em EPA e à diminuição em DHA, (Figs. 39 e 40).

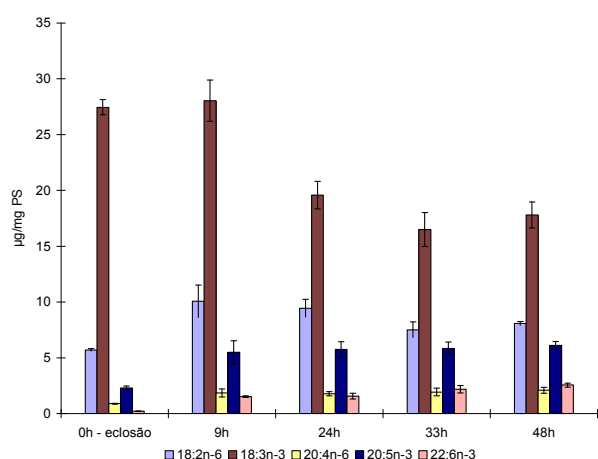


Figura 39 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com 50% de *Nannochloropsis oculata* e 50% de *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)* durante quatro períodos de tempo.

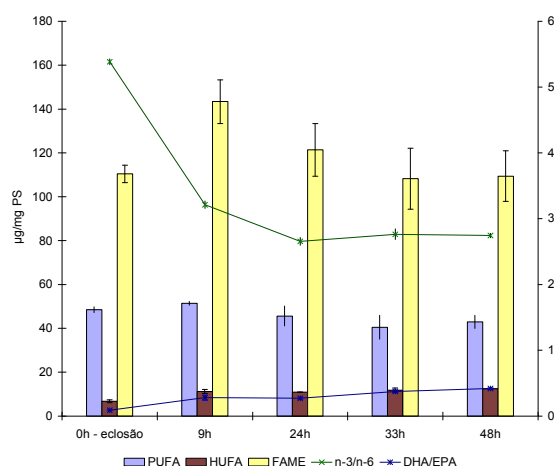


Figura 40 - Evolução do perfil nos grupos ácidos de gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com 50% de *Nannochloropsis oculata* e 50% de *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)* durante quatro períodos de tempo.

Quando se comparam os resultados do enriquecimento dos náuplios, separadamente e nas mesmas condições dos anteriores, em *Nannochloropsis oculata* e em *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)*, (Fig. 38), durante quatro períodos de tempo, verifica-se que o perfil de *Artemia* spp. corresponde ao perfil da microalga utilizada. Deste modo, pode observar-se que no que respeita a ARA (20:4n-6) e DHA (22:6n-3) e à relação DHA/EPA os valores são superiores nos náuplios enriquecidos em *Isochrysis aff. galbana (T-Iso)*. No que se refere a EPA (20:5n-3) os valores são mais elevados para os náuplios enriquecidos com a microalga *Nannochloropsis oculata* (Fig. 41).

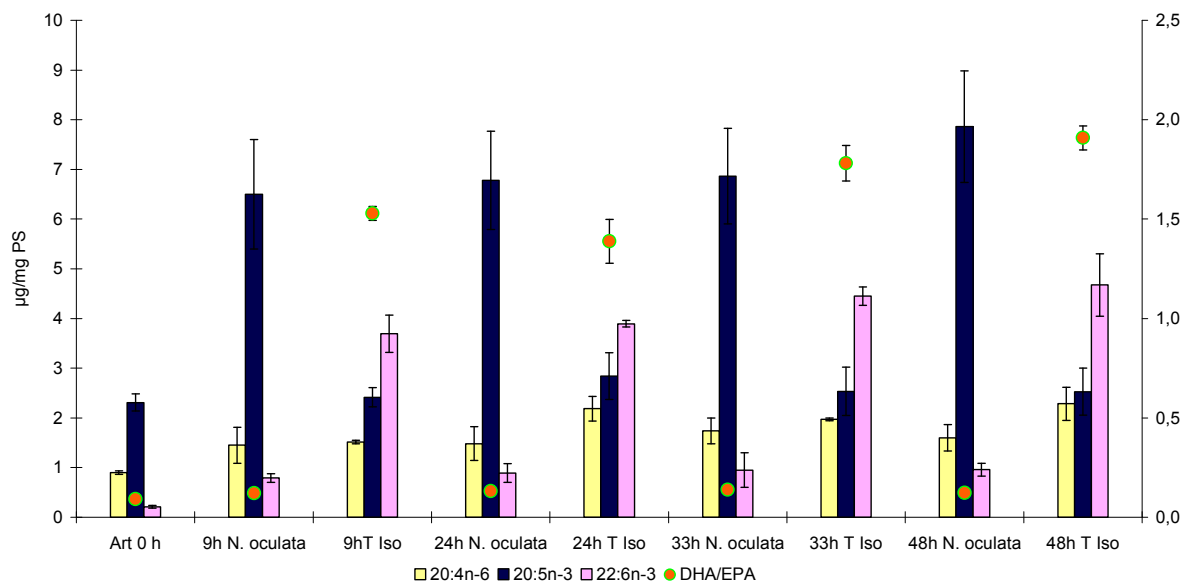


Figura 41 - Evolução do perfil em C20:4n-6, C20:5n-3 e C22:6n-3 e relação DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada em *Nannochloropsis oculata* e em *Isochrysis aff. galbana* (T-Iso) durante quatro períodos de tempo.

Deste modo, o período de bioencapsulação de *Artemia spp.* utilizando microalgas deverá ser o mais prolongado que se conseguir, tendo em conta a dimensão das larvas a que se destinam. Deverá também ser escolhida a microalga ou mistura de microalgas que mais corresponda ao perfil pretendido.



### - Bioencapsulação de *Artemia* spp. com emulsões lipídicas preparadas em laboratório.

Considerando os vários perfis obtidos nos enriquecimentos com microalgas fizeram-se os mesmos tipos de ensaios com emulsionados à base de óleos. Utilizaram-se óleos de origem animal (óleo de fígado de bacalhau e óleo de lula), ovos frescos de dourada (subproduto bastante abundante nas maternidades uma vez que não se necessita de larvas para preencher os tanques) e óleos de origem vegetal (óleo de girassol, óleo de linhaça e óleo de amendoim).

Os ensaios de bioencapsulação de *Artemia* spp., estirpe C, foram efectuados com uma densidade de 250 art.mL<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25 °C (de modo a ser comparável com os anteriores), durante períodos de 9h, 24h, 33h e 48h. A duração dos ensaios teve em conta por um lado a dimensão de *Artemia* spp. que se pretende obter, por outro o seu perfil em ácidos gordos. Utilizou-se o perfil de náuplios recém eclodidos como ponto de partida para comparar o efeito da bioencapsulação.

Nas Figuras 42 e 43 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h, com um emulsionado com óleo de fígado de bacalhau. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento de EPA (20:5n-3), que aumenta logo substancialmente ao fim de 9h de enriquecimento, e mais moderadamente para DHA (22:6n-3). No entanto, o melhor perfil nestes ácidos gordos, no perfil em HUFA, no perfil em PUFA e na relação DHA/EPA são obtidos ao fim de 48h de enriquecimento.

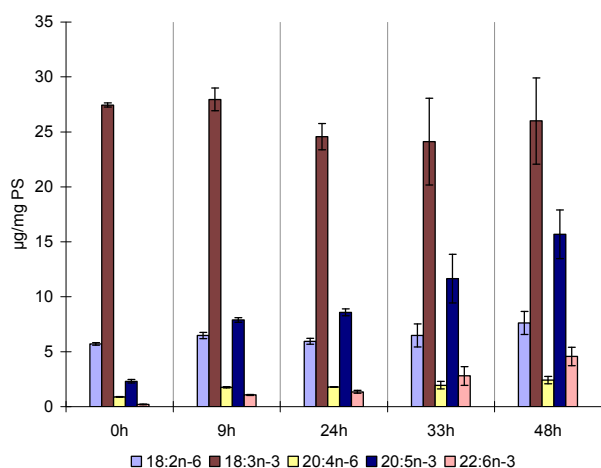


Figura 42 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de fígado de bacalhau durante quatro períodos de tempo.

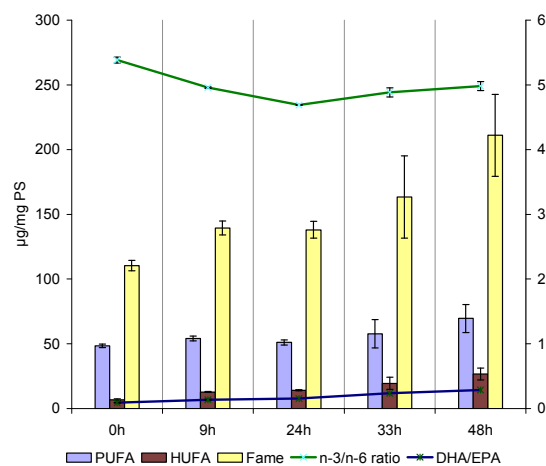


Figura 43 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de fígado de bacalhau durante quatro períodos de tempo.

Nas Figuras 44 e 45 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h com um emulsionado com óleo de lula. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento de EPA (20:5n-3), e para DHA (22:6n-3) que aumentam substancialmente ao fim de 9h de enriquecimento.

Também neste caso, o melhor perfil nestes ácidos gordos, no perfil em HUFA, no perfil em PUFA e na relação DHA/EPA são obtidos com enriquecimento prolongado, ao fim de 33h e 48h de enriquecimento. *Artemia spp.* bioencapsulada com este óleo apresenta valores mais elevados quer em EPA quer em DHA, quando comparada com a bioencapsulada com óleo de fígado de bacalhau e uma melhor relação DHA/EPA.

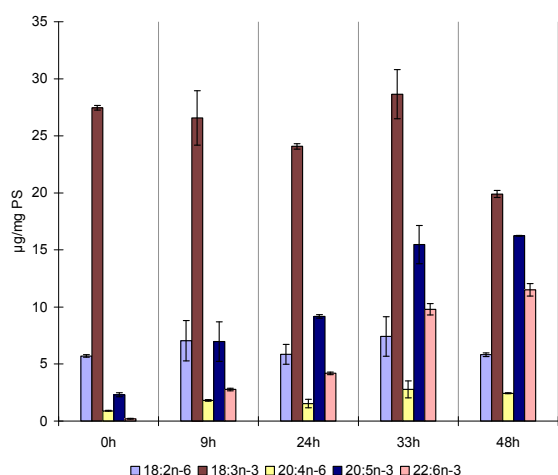


Figura 44 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de lula durante quatro períodos de tempo.

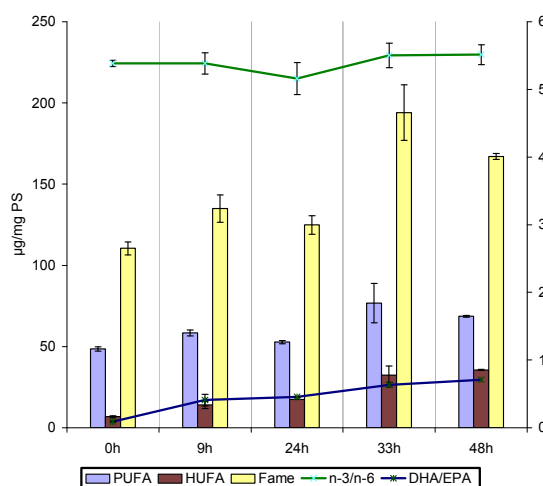


Figura 45 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de lula durante quatro períodos de tempo.

Nas Figuras 46 e 47 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h com um emulsionado com óleo de girassol. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando pouco ao longo do tempo, apenas com a exceção do ácido linoleico (18:2n-6) que aumenta substancialmente e do ácido linolénico (18:3n-3) que diminui. Estes resultados reflectem o perfil do óleo utilizado, não bioencapsulando os náuplios nos ácidos gordos importantes para os peixes marinhos, independentemente do tempo de duração da bioencapsulação.

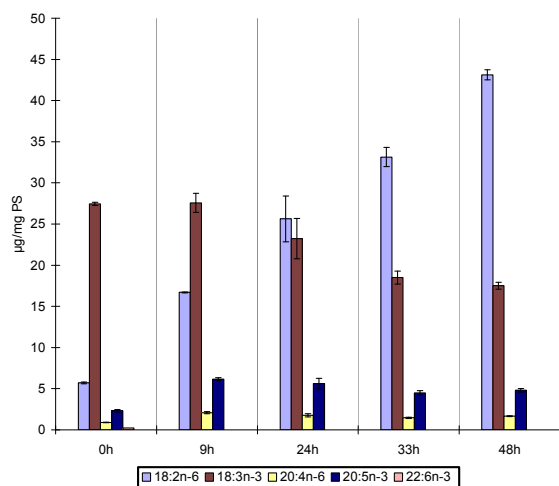


Figura 46 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de girassol durante quatro períodos de tempo.

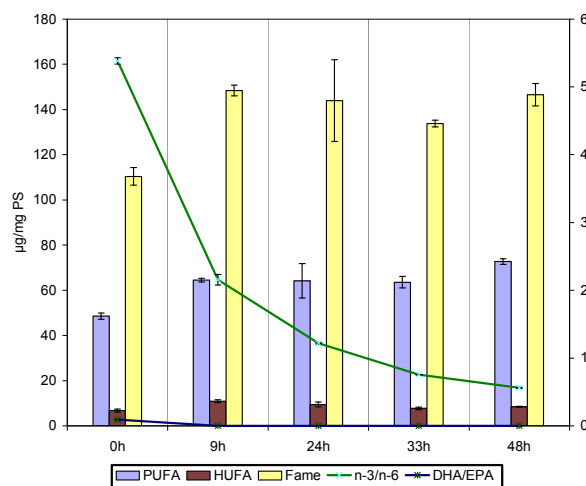


Figura 47 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de girassol durante quatro períodos de tempo.

Nas Figuras 48 e 49 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h com um emulsionado com óleo de linhaça. Também neste caso se verifica que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando pouco ao longo do tempo, apenas com a excepção do ácido linoleico (18:2n-6) que tem um aumento gradual ainda que pouco significativo e do ácido linolénico (18:3n-3) que aumenta substancialmente, ao contrário do enriquecimento com óleo de girassol. Estes resultados também reflectem o perfil do óleo utilizado, não bioencapsulando os náuplios nos ácidos gordos importantes para os peixes marinhos, independentemente do tempo de duração da bioencapsulação.

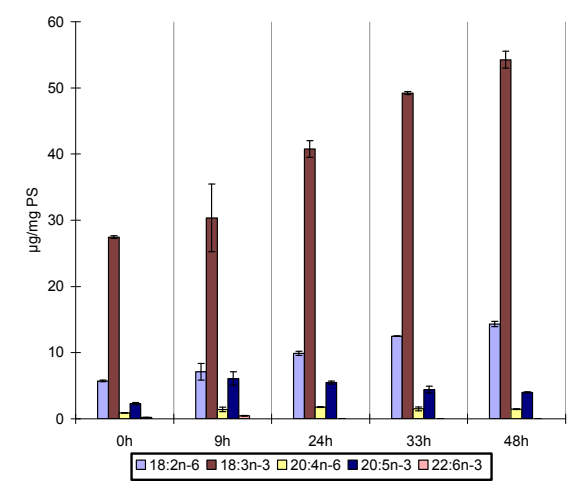


Figura 48 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de linhaça durante quatro períodos de tempo.

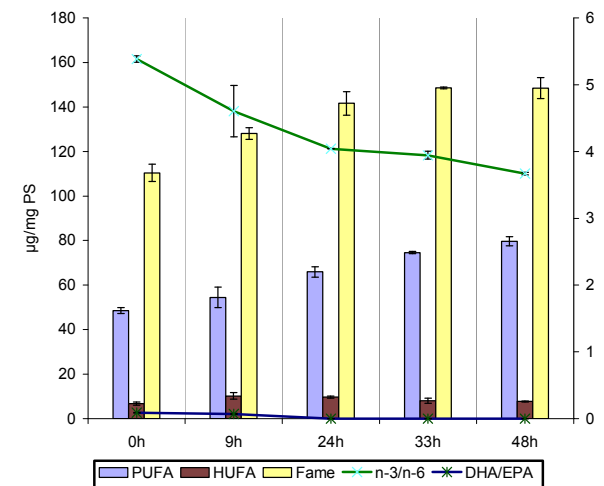


Figura 49 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de linhaça durante quatro períodos de tempo.

Nas Figuras 50 e 51 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos ao longo de 48h com um emulsionado com óleo de amendoim. Uma vez mais, se verifica que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando pouco ao longo do tempo, apenas com a excepção do ácido linoleico (18:2n-6) que aumenta substancialmente e do ácido linolénico (18:3n-3) que diminui um pouco, também neste caso de forma diferente que nos anteriores enriquecimentos com óleos de origem vegetal. Estes resultados também reflectem o perfil do óleo utilizado, não bioencapsulando os náuplios nos ácidos gordos importantes para os peixes marinhos, independentemente do tempo de duração da bioencapsulação.

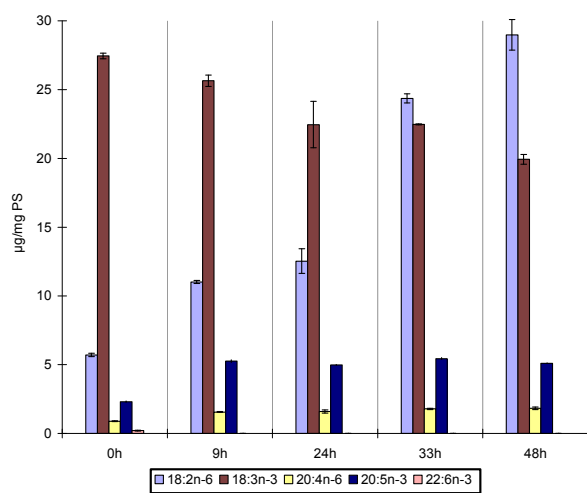


Figura 50 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de amendoim durante quatro períodos de tempo.

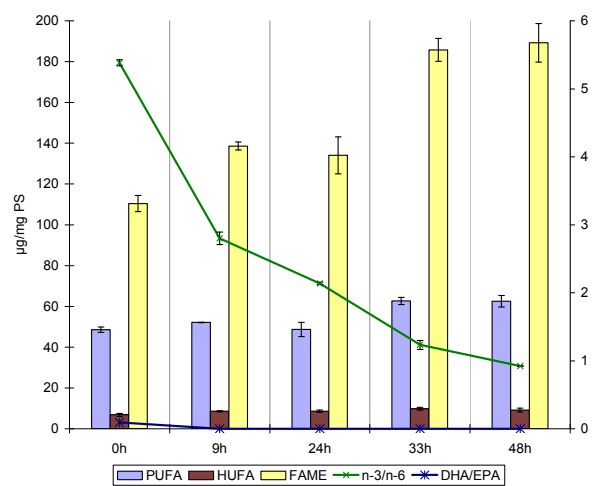


Figura 51 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado de óleo de amendoim durante quatro períodos de tempo.

Nas Figuras 52 e 53 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém-eclodidos, estirpes M (marinha) e C (continental) e de náuplios enriquecidos 24h com ovos frescos de dourada. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos, tem um comportamento semelhante ao obtido com os outros óleos de origem animal. Observa-se que EPA (20:5n-3) aumenta moderadamente no caso da estirpe marinha e mais significativamente no caso da estirpe continental (com um valor mais baixo à eclosão) mas que DHA (22:6n-3) aumenta substancialmente ao fim de 24h de enriquecimento, em ambos os casos. Também neste caso, o perfil nestes ácidos gordos, o perfil em HUFA, o perfil em PUFA e na relação DHA/EPA se aproximam mais das necessidades das larvas dos peixes marinhos quando comparados com as bioencapsulações efectuadas com emulsionados à base de óleos vegetais. *Artemia* spp. bioencapsulada com ovos frescos de dourada apresenta a melhor relação DHA/EPA.

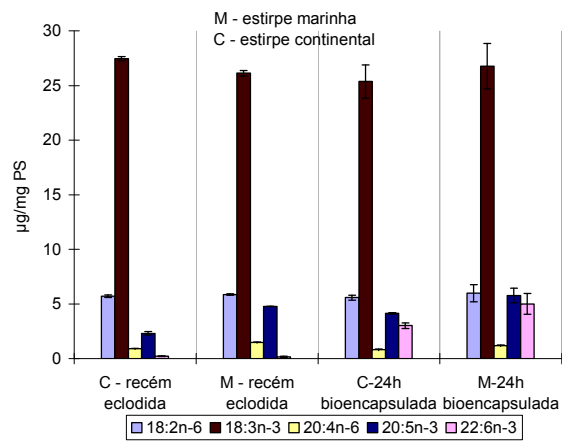


Figura 52 - Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp., estirpe M e estirpe C, recém eclodida e bioencapsulada durante 24h com ovos de dourada.

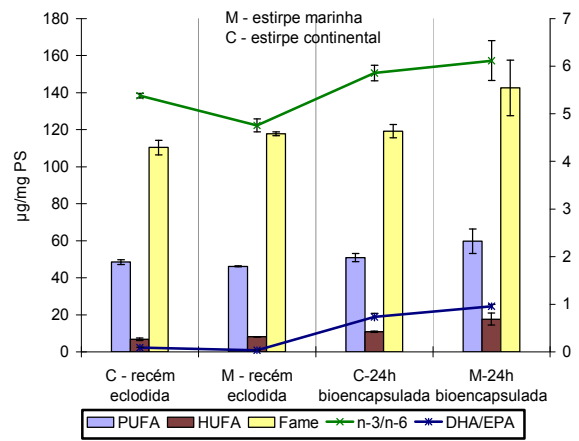


Figura 53 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia* spp. estirpe M e estirpe C, recém eclodida e bioencapsulada durante 24h com ovos de dourada.

### - Bioencapsulação de *Artemia* spp. com emulsões lipídicas comerciais.

Nas Figuras 54 e 55 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de náuplios enriquecidos ao longo de 12h, com ovos frescos de dourada, com ovos liofilizados de dourada e com o produto comercial Algamac<sup>®</sup>. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos aumenta logo ao fim de 3h, principalmente no que se refere a DHA (22:6n-3) no caso de bioencapsulação com Algamac<sup>®</sup>. Ao longo do período de enriquecimento o perfil em EPA e em DHA vai apenas ter um ligeiro aumento e no caso do Algamac<sup>®</sup> verifica-se que o perfil em DHA diminui, provavelmente devido à menor disponibilidade do produto quer à sua parcial oxidação (McEvoy *et al.*, 1995).

Parece deste modo, que com a utilização de Algamac<sup>®</sup> na bioencapsulação de náuplios de *Artemia* spp. se conseguem ao fim de 3h níveis de DHA bastante mais elevados que em qualquer dos casos analisados anteriormente. No entanto, a utilização do produto (quantidade, periodicidades das refeições e tempo de bioencapsulação) terá de ser melhor analisada tendo em conta os resultados aqui apresentados.

Tal como no caso anterior, os ovos de dourada parecem ser um bom subproduto a utilizar na bioencapsulação de *Artemia* spp. Este tipo de aproveitamento e utilização com sucesso dos ovos de dourada já foi descrito no capítulo anterior sobre produção e bioencapsulação de rotíferos.

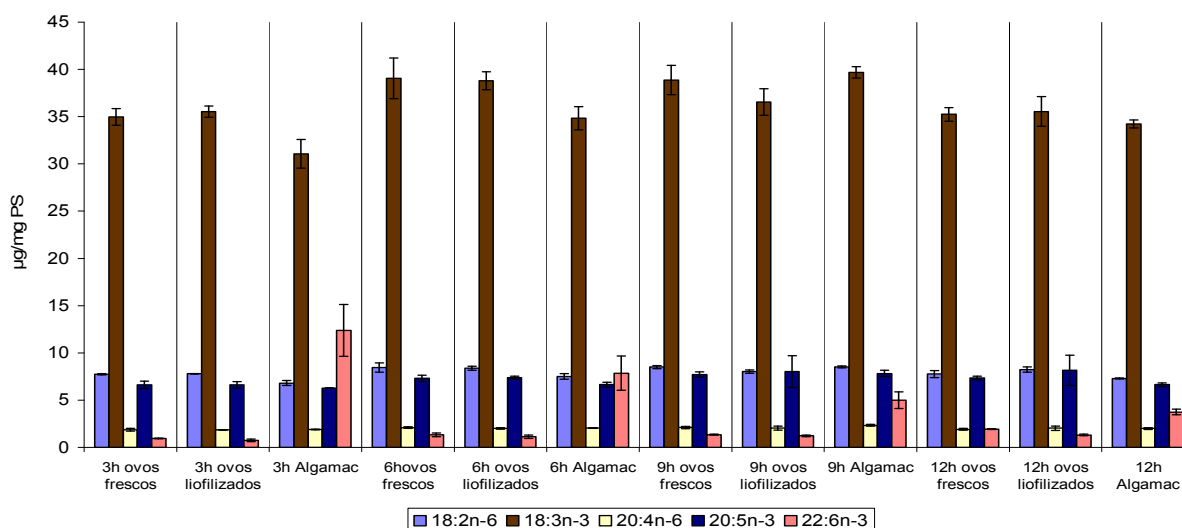


Figura 54 - Perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp., estirpe C, recém eclodida e bioencapsulada durante 12h com ovos de dourada e Algamac.



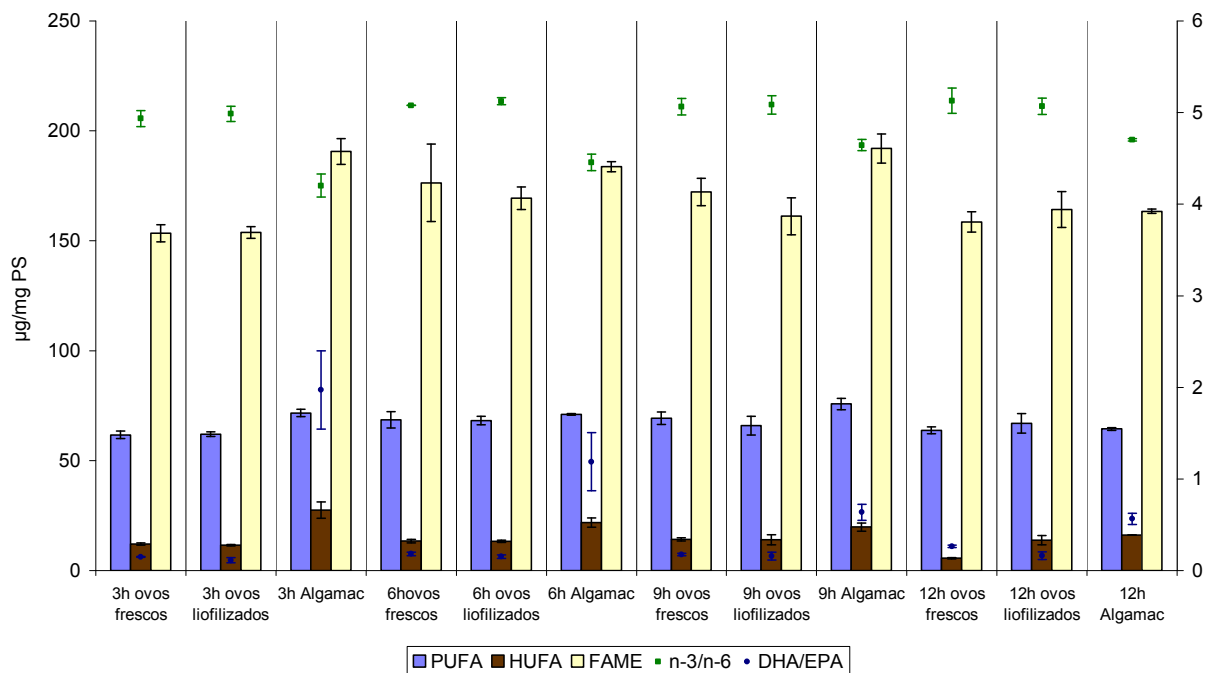


Figura 55 - Perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* estirpe M e estirpe C, recém eclodida e bioencapsulada durante 12h com ovos de dourada e Algamac.

Nas Figuras 56 e 57 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos com um emulsionado comercial (Super Selco®) durante seis períodos de tempo. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento de EPA (20:5n-3), e para DHA (22:6n-3) que aumentam substancialmente ao fim de 48h de enriquecimento. Também neste caso, o melhor perfil nestes ácidos gordos, no perfil em HUFA, no perfil em PUFA e na relação DHA/EPA são obtidos com enriquecimento prolongado, ao fim de 48h. *Artemia spp.* bioencapsulada com este emulsionado comercial apresenta valores substancialmente mais elevados quer em EPA quer em DHA, quando comparada com a bioencapsulada com microalgas e uma melhor relação DHA/EPA.

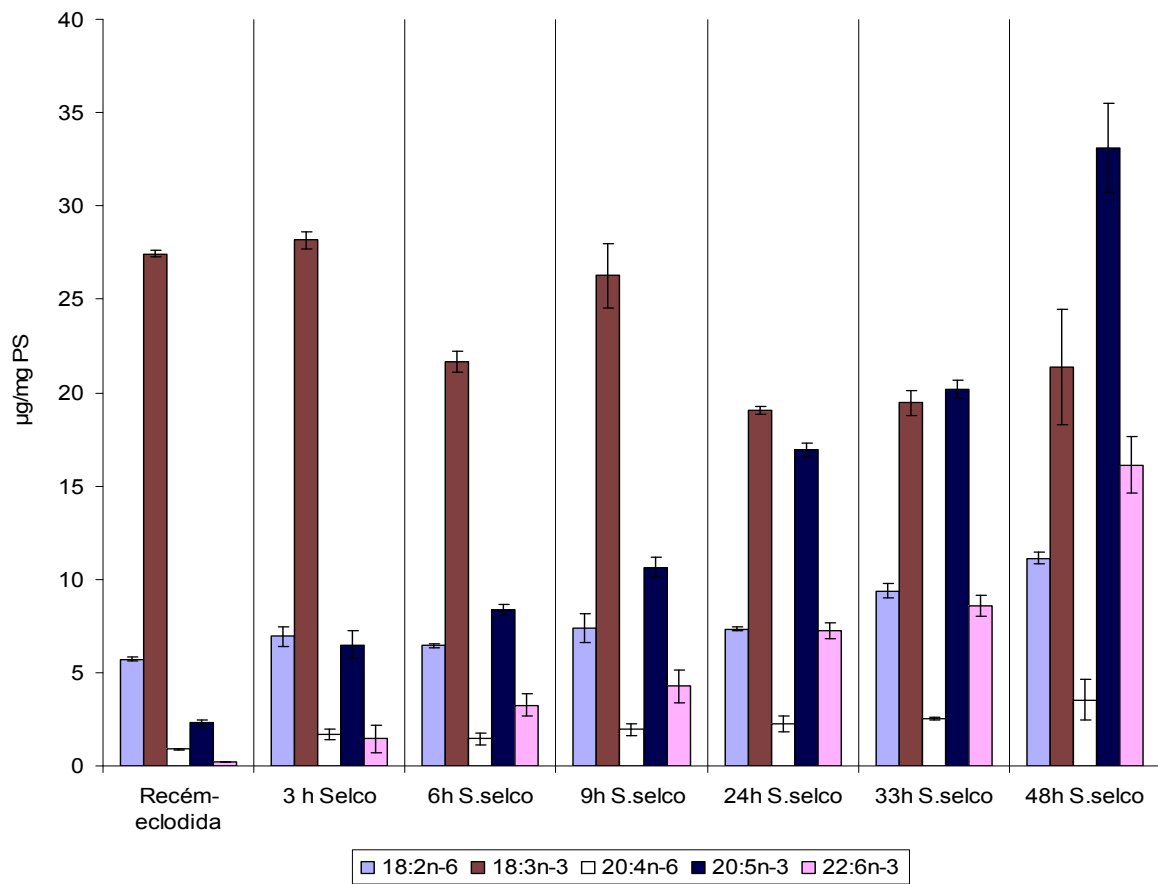


Figura 56 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C), bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Selco®) durante seis períodos de tempo.

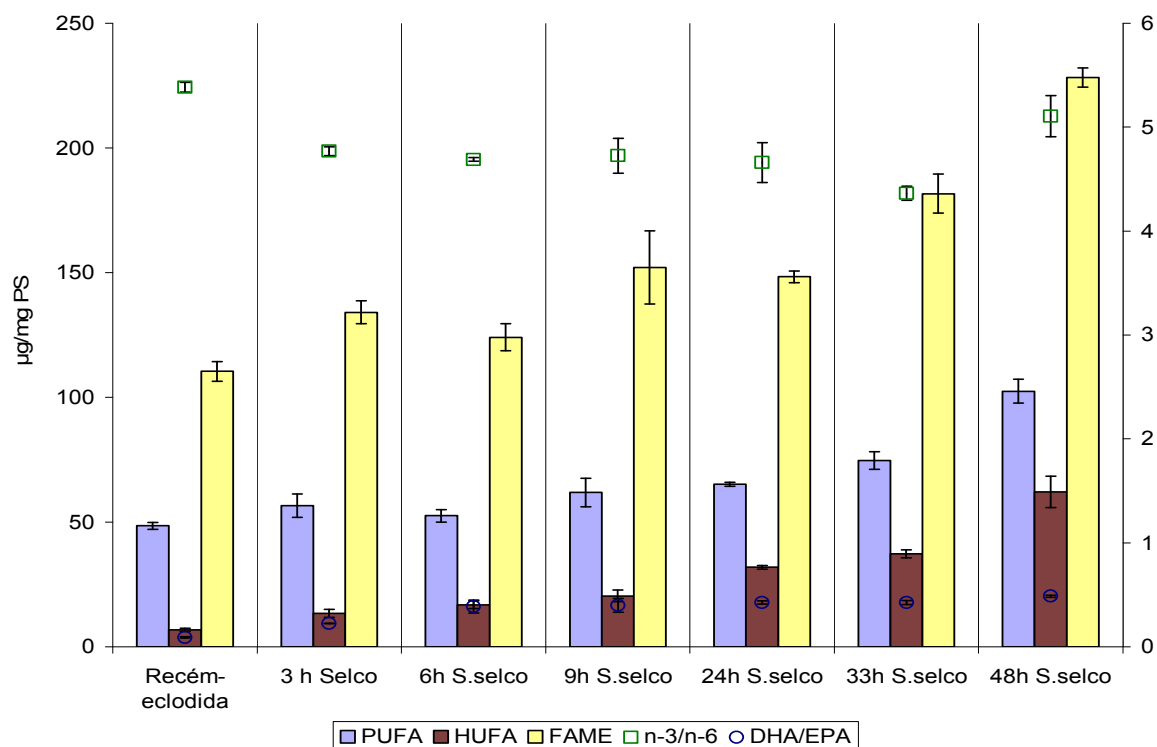


Figura 57 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Selco®) durante seis períodos de tempo.

Nas Figuras 58 e 59 apresenta-se o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios recém eclodidos e de náuplios enriquecidos com um emulsionado comercial (Super Artemia®) durante quatro períodos de tempo. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos se vai alterando ao longo do tempo com especial relevo para o aumento de EPA (20:5n-3), e para DHA (22:6n-3) que aumentam substancialmente ao fim de 30h de enriquecimento. Também neste caso, o melhor perfil nestes ácidos gordos, no perfil em HUFA, no perfil em PUFA e na relação DHA/EPA são obtidos com enriquecimento prolongado, ao fim de 30h. *Artemia spp.* bioencapsulada com este emulsionado comercial apresenta valores semelhantes ao produto anterior (Super Selco®) mas substancialmente mais elevados quer em EPA quer em DHA, quando comparada com a bioencapsulada com microalgas e uma melhor relação DHA/EPA.

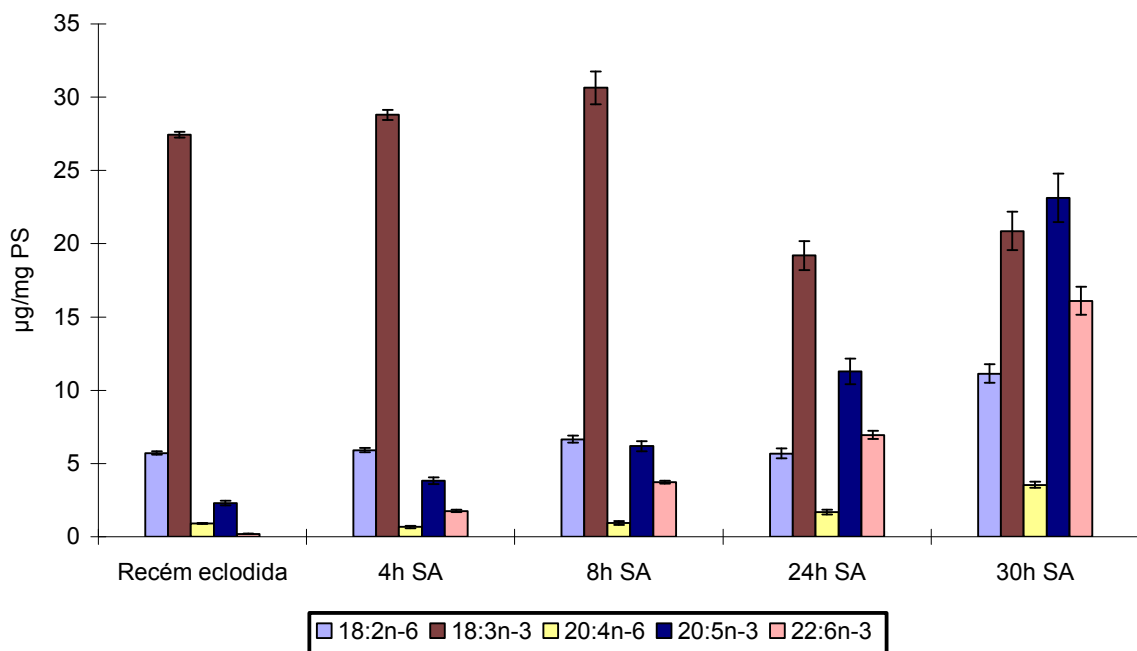


Figura 58 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C) recém eclodida e bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Artemia®) durante 4h, 8h, 24h e 30h.

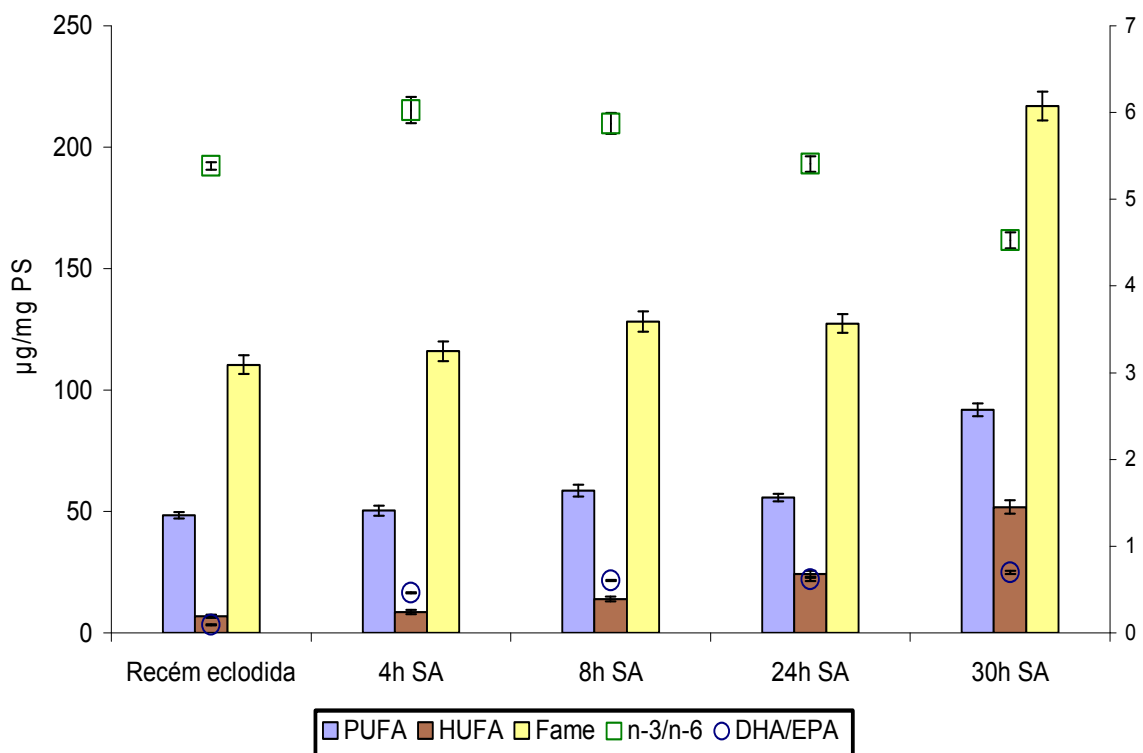


Figura 59 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) recém-eclodida e bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Artemia®) durante 4h, 8h, 24h e 30h.

Nas Figuras 60 e 61 apresenta-se a comparação entre o perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos, de náuplios enriquecidos com um emulsionado comercial (Super HUFA<sup>®</sup>) e um emulsionado com óleo de amendoim durante três períodos de tempo. Verifica-se que o perfil nos ácidos gordos é completamente diferente, constatando-se por um lado que os óleos que compõem estas emulsões são de origens diferentes, provavelmente óleo de peixe ou similar no caso do Super Hufa e que *Artemia* spp. reflecte o conteúdo das emulsões. Por outro lado, apenas no caso do Super Hufa se consegue enriquecer os náuplios em DHA (22:6n-3) que vai aumentando ao longo do período de enriquecimento. No caso do enriquecimento com a emulsão com óleo de amendoim, os náuplios apresentam o perfil em EPA (20:5n-3), inferior ao dos enriquecidos com Super Hufa e que se mantém constante. Tendo em conta que EPA não se encontra presente no óleo de amendoim, este provavelmente terá sido sintetizado pelos náuplios a partir do ácido linolénico (18:3n-3) que se encontra em quantidade neste óleo vegetal. Outra hipótese é ter origem no produto utilizado na emulsão, a lecitina de ovos. No que se refere ao perfil nos principais grupos de ácidos gordos, o perfil em HUFA é superior na emulsão comercial assim como a razão n-3/n-6 e a razão DHA/EPA, que aumentam ao longo do período de enriquecimento. *Artemia* spp. bioencapsulada com este produto comercial apresenta valores inferiores aos produtos anteriores (Super Selco<sup>®</sup> e Super Artemia<sup>®</sup>) mas valores mais elevados quer em EPA quer em DHA e uma melhor relação DHA/EPA, quando comparada com a bioencapsulada com microalgas

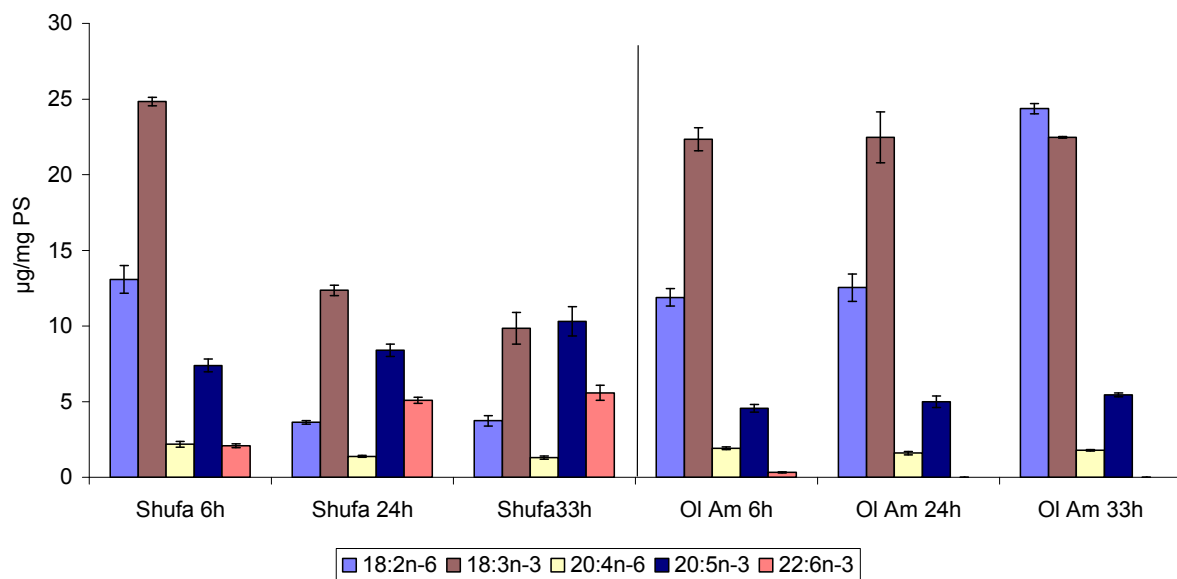


Figura 60 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super HUFA<sup>®</sup>), um emulsionado com óleo de amendoim durante 6h, 24h e 33h.

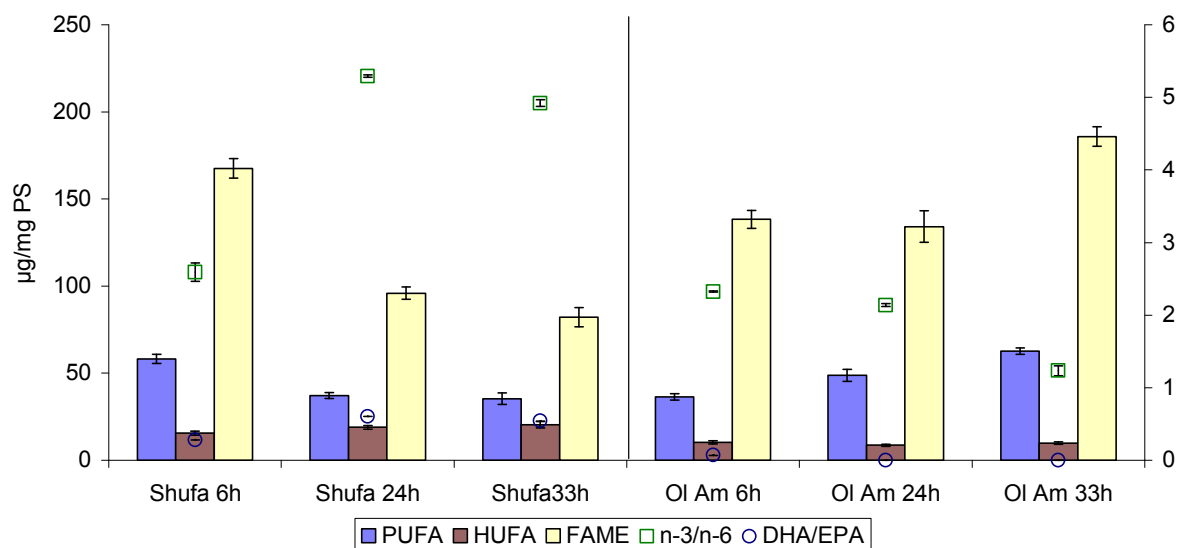


Figura 61 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super HUFA<sup>®</sup>), um emulsionado com óleo de amendoim durante 6h, 24h e 33h.

### - Fornecimento de náuplios aos tanques larvares

A periodicidade de alimentação dos tanques larvares de peixes marinhos é outro factor importante porque o perfil lipídico dos náuplios apresentado atrás corresponde ao período imediatamente a seguir à bioencapsulação. Deste modo, analisámos o valor nutritivo de *Artemia* spp. bioencapsulada e sujeita a inanição por períodos de tempo semelhantes aos que permanecem nos tanques larvares sem serem consumidas e sem se alimentarem.

Assim, após a sua introdução nos tanques o valor nutritivo vai diminuindo e quanto mais tarde forem os náuplios ingeridos pelas larvas pior será o seu perfil em HUFA. Por outro lado, também crescem podendo atingir dimensões que não possibilitem a sua ingestão pelas larvas, acumulando-se assim nos tanques. Deste modo, é fundamental calcular o número aproximado de náuplios que poderão ser ingeridos num curto período de tempo de forma a evitar estas duas complicações. Nas figuras 62 e 63 mostra-se o perfil lipídico de náuplios ao fim de algumas horas de jejum a 19-20°C, situação semelhante á dos tanques larvares de peixes.

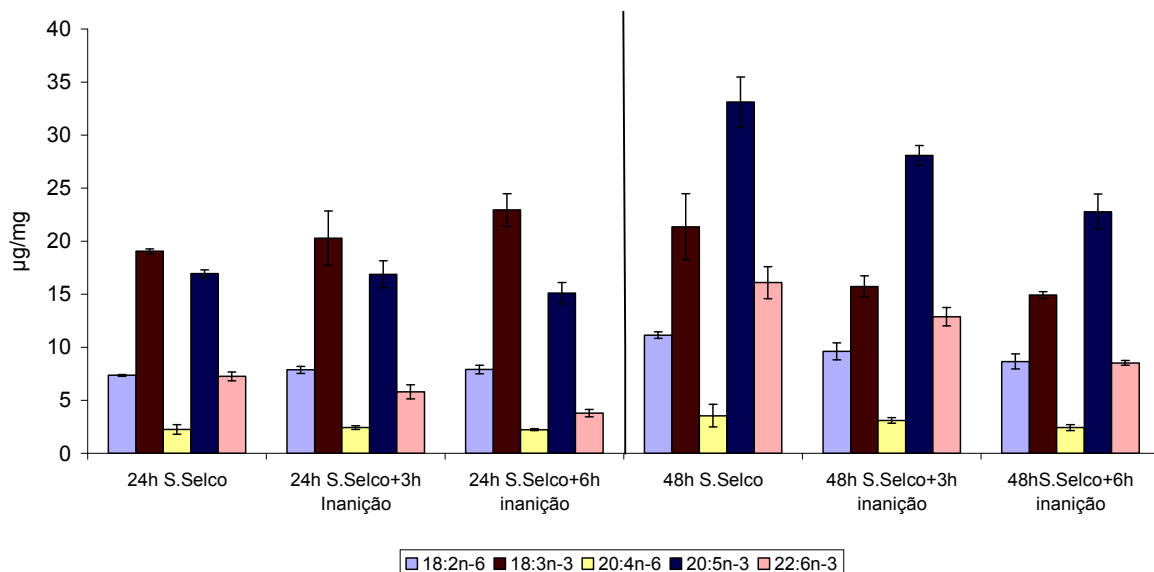


Figura 62 - Evolução do perfil nos ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos de *Artemia* spp. (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Selco®) durante 24h e 48h e sujeita a inanição 3h e 6h.

Consideramos, com base nestes resultados, que a gestão da utilização de náuplios de *Artemia* spp. em tanques de larvas de peixes marinhos é de primordial

importância. Se, como observamos, quanto maior for o tempo de bioencapsulação maior será o conteúdo lipídico também maior será a dimensão do náuplio e por consequência poderá estar fora da dimensão adequada para a idade da larva da espécie que estamos a alimentar. Existe deste modo um compromisso entre dimensão do náuplio, dimensão da boca da larva de peixe - que para uma mesma idade varia consoante a espécie - e perfil lipídico exigido.

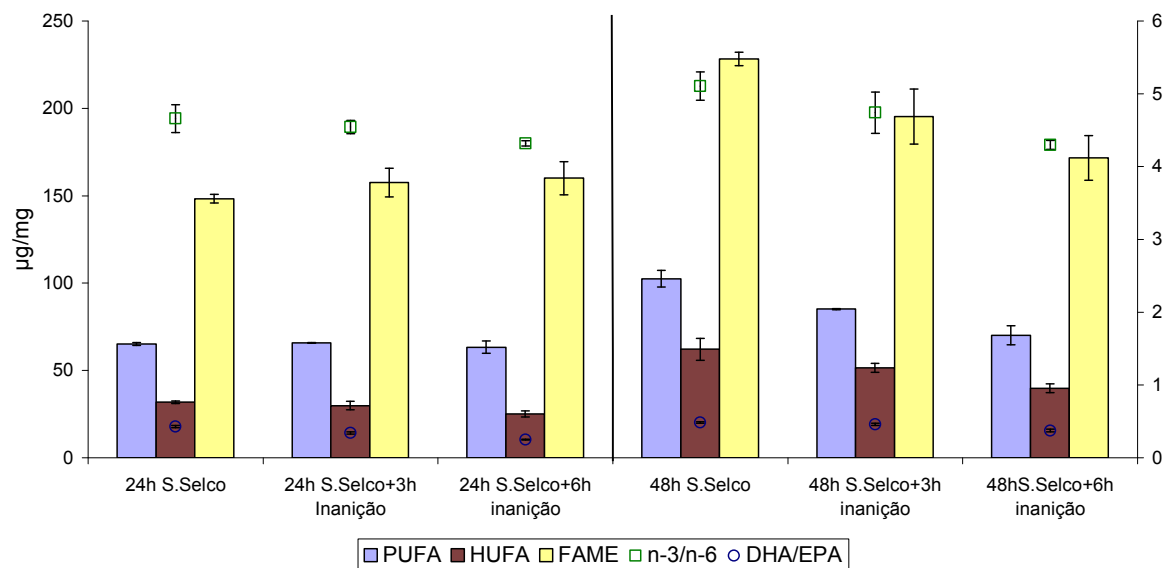


Figura 63 - Evolução do perfil nos grupos de ácidos gordos importantes para larvas de peixes marinhos e relação n-3/n-6 e DHA/EPA de *Artemia spp.* (estirpe C) bioencapsulada com um emulsionado comercial (Super Selco®) durante 24h e 48h e sujeita a inanição 3h e 6h.

No trabalho Narciso et al, 1998 apresenta-se o perfil em ácidos gordos de náuplios de *Artemia spp.* enriquecida com vários outros produtos comerciais e emulsões com óleos de várias origens. Os ensaios efectuados foram do mesmo tipo dos anteriormente apresentados e nele é descrita a metodologia empregue na extracção, purificação e quantificação dos ácidos gordos.



- Efeito do enriquecimento da cadeia trófica para a larvicultura de *Sparus aurata*

Como se pôde constatar pelos vários ensaios de bioencapsulação e de inanição quer os rotíferos quer *Artemia spp.* reflectem no seu perfil em ácidos gordos, o perfil dos produtos utilizados na sua alimentação. Verificámos que existe, para a maioria dos produtos, uma relação entre o tempo de bioencapsulação e o perfil lipídico final destas presas. No trabalho seguinte apresenta-se e discute-se o efeito combinado da bioencapsulação de rotíferos e de *Artemia spp.* na composição lipídica de larvas de dourada (*Sparus aurata*).

Verifica-se no mesmo, que as larvas de dourada reflectem a composição lipídica das presas pelo que a sua bioencapsulação nos ácidos gordos mais importantes para as larvas é essencial para o seu crescimento e sobrevivência.

No entanto, como se verificou anteriormente e se pode constatar no trabalho Pousão-Ferreira *et al*, 1997 nenhum dos produtos disponíveis para bioencapsulação de rotíferos ou de *Artemia spp.* consegue que estes atinjam os perfis de ácidos gordos quer dos ovos quer das larvas recém eclodidas de dourada.

### Considerações finais sobre a utilização de *Artemia* spp.

Para além das metodologias descritas sobre a obtenção de náuplios e a sua produção com vista à utilização em aquacultura, do ponto de vista de qualidade em ácidos gordos essenciais para as larvas de peixes marinhos deverá dar-se especial atenção a:

- Composição do produto a utilizar na bioencapsulação,
- Tempo de bioencapsulação,
- Disponibilidade do produto de bioencapsulação durante todo o período de enriquecimento,
- Período de tempo entre a bioencapsulação e a ingestão dos náuplios por parte das larvas de peixes marinhos.

A utilização de náuplios de *Artemia* spp. deverá deste modo ser gerida tendo em consideração:

1. A espécie de larva de peixe a que se destina,
2. A idade da larva (dimensão da boca), em função da temperatura da água, que poderá ser expressa em dias de cultivo ou em graus/dia,
3. A necessidade diária de náuplios recém-eclodidos ou com maiores dimensões. Utilizam-se diferentes estirpes de *Artemia* spp. conforme o objectivo devido às diferenças de custo do cistos,
4. A preservação ao longo do dia das características morfométricas e valor nutritivo dos náuplios,
5. A vantagem, sempre que é possível, de utilizar náuplios de maiores dimensões e mais ricos em lípidos, bioencapsulados com produtos apropriados. Com a utilização de náuplios de maiores dimensões reduz-se o consumo destes e o esforço de captura das larvas de peixes para se alimentarem,
6. O custo final de produção das larvas de peixes.

Também em relação à bioencapsulação de *Artemia* spp. existe a necessidade de encontrar fontes de ácidos gordos alternativas que vão mais de encontro ao perfil encontrado nos ovos e larvas das várias espécies.

## Referências bibliográficas

1. Amat, F., 1985. Utilization de Artemia en acuicultura." *Inf.Tecn.Inst.Inv.Pesq.* - (128-129) (2): 3-59.
2. Anderson, D. T., 1967. Larval development and segment formation in branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). *Aust. J. Zool.* 15: 47-91.
3. Barclay, W. & Zeller, S., 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):314-322.
4. Crowe, J. H.; Crowe, L.M. Drinkwater, L. & Busa, W. B., 1987. Intracellular pH and anhydrobiosis in Artemia cysts. *In: "Artemia Research and its application".* Vol.2. (P. Sorgeloos; D. A. Bengtson; W. Decleir & E. Jaspers eds), pp.19-40. Universa Press, Wetteren, Belgium.
5. Dhont, J & Stappen, G.V., 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia*. *In: "Live Feeds in Marine Aquaculture".* (Ed. By Stottrup, J.G. and McEvoy, L.A), pp.65-121. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
6. Drinkwater, L. E. & Clegg, J. S., 1991. Experimental biology of cyst diapause. *In: "Artemia Biology"* (R.A. Browne; P. Sorgeloos & C. Trotman, eds), pp. 93-117. CRC Press.
7. Evjemo, J. O.; Danielsen, T. L. & Olsen, Y., 2001. Losses of lipid, protein and n-3 fatty acids in enriched *Artemia franciscana* starved at different temperatures. *Aquaculture* 193: 65–80.
8. Faulk, C.K., & Holt, G.J., 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: Live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture* 249, 231-243.
9. Gelabert R, F., 2003. Bioencapsulation in Artemia: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process Bioencapsulation in Artemia: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process. *Aquaculture* 216:143–153.
10. Gozalbo, A.; Amat, F.; Hontoria, F.; Navarro, J.C. y Varo, I., 1987. Composición bioquímica de Artemia alimentada con diferentes dietas." *Cuad. Marisq. Publ. Tec.* 12(35): 585-590.

11. Gozalbo, A.; Navarro, J.C.; Hontoria, F.; Varo, I. & Amat, F., 1989. Composition bioquímica de biomásas cultivadas de *Artemia*. *Acuicultura Intermareal-Inst. C. Mar. Andal* 59: 193-201.
12. Han, K.; Geurden, I. & Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of *n*-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 183: 335–347.
13. Hanaee, J.; Aghb, N.; Hanaee, M.; Delazar, A. & Sarker, S. D., 2005. Studies on the enrichment of *Artemia urmiana* cysts for improving fish food value. *Animal Feed Science and Technology*. 120: 107–112.
14. Keilin, D., 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Royal Soc. London*. B150: 149-191.
15. Koven, W. M.; Tandler, A.; Kissil, G. W. & Sklan, D. 1992. The importance of *n*-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104 (1-2): 91-104.
16. Lavens, P. & Sorgeloos, P., 1987. The cryotobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. *In*: “*Artemia* Research and its application”. Vol.3 (P. Sorgeloos; D. A. Bengtson; W. Declerck & E. Jaspers eds), pp.27-63. Universa Press, Wetteren, Belgium.
17. Leger, P.; Bengtson, D.A.; Simpson, K.L. and Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source.” *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24(95): 521-623.
18. Liao, I-C.; Su, H-M.; Lin, J-H., 1983. Larval foods for penaeid prawns. In “CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture” (McVey, J. P., ed), 1, pp. 43-69. Boca Raton, Florida, USA.
19. Lim, L. C.; Cho, Y. L.; Dhert, P.; Wong, C. C. Nelis, H. & Sorgeloos, P., 2002. Use of descapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. *Aquaculture Research*. 33: 113-120.
20. Marques, A.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. & Bossier, P., 2004. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 312: 115– 136.

21. Marques, A.; Thanh, T. H.; Sorgeloos, P. & Bossier, P., 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture* 258: 116–126.
22. McEvoy, L. A.; Navarro, J. C.; Bell, J. G. & Sargent, J. R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134: 101-112.
23. McEvoy, L.A.; Navarro, J.C.; Hontoria, F.; Amat, F. & Sargent, J.R., 1996. Two novel artemia enrichment diets containing polar lipid. *Aquaculture*, 144 (4):339-352.
24. Monroig, O.; Navarro, J. C.; Amat, I.; González, P.; Amat, F. & Hontoria, F., 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. *Aquaculture International* 11: 151–161.
25. Monroig, O.; Navarro, J. C.; Amat, F.; González, P.; Bermejo, A. & Hontoria, F., 2006a. Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 251: 491– 508.
26. Monroig, O.; Navarro, J. C.; Amat, F.; González, P. & Hontoria, F., 2006b. Effects of naupliar density, product concentration and product dosage on the survival of the nauplii and EFA incorporation during *Artemia* enrichment with liposomes. *Aquaculture* 261: 659-669.
27. Nambu, Z.; Tanaka, S. & Nambu, F., 2004. Influence of photoperiod and temperature on reproductive mode in the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Journal Of Experimental Zoology*. 301A:542–546.
28. Narciso, L., 1987. A utilização dos cistos de *Artemia* sp. em aquacultura. Provas de Aptidão Pedagógica, F.C.U.L, 80p.
29. Narciso, L., Pousão-Ferreira, P.; Passos, A. & Luís, O., 1999. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Artemia* sp. with commercial oils during different enrichment periods. *Aquaculture Research* 30(1): 21-24.
30. Narciso, L., 2000. Biologia e cultivo de *Artemia* sp. (Crustácea, Branchiopoda): Sua utilização em aquacultura. Câmara Municipal de Cascais, “Prémio do mar Rei D. Carlos 1998”, 94 pp.
31. Navarro, J. C.; Henderson, R. J.; McEvoy, L. A.; Bell, M. V. & Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174:155–166.

32. Pousão-Ferreira, P.; Luis, O.; Passos, A. & Narciso, L., 1996. HUFA content and DHA/EPA improvements of *Brachionus plicatilis* for sea bream (*Sparus aurata*) larvae. In: "Live Food Organisms and Marine Larviculture, Nagasaki, Japão, 1-4 September 1996, 5pp.
33. Pousão-Ferreira, P.; Cairrão, F.; Nery, F. & Narciso, L. 1997. The fatty acid profile of *Sparus aurata* larvae is correlated to the composition of the enrichments diets of *Brachionus plicatilis* and *Artemia sp.* *Ciencias Marinas* 23(1):83-92.
34. Olsen, A. I.; Jensen, A.; Evjemo, J. O. & Olsen, Y. 1997. Effect of algal addition on stability of fatty acids in enriched *Artemia franciscana*. *Hydrobiologia* 358: 205–210.
35. Olsen, A. I.; Mæland, A.; Waagø, R. & Olsen, Y., 2000. Effect of algal addition on stability of fatty acids and some water-soluble vitamins in juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture Nutrition* 6: 263-273.
36. Ritar, A. J.; Dunstan, G. A.; Nelson, M. M.; Brown, M.R.; Nichols, P. D.; Craig W. Thomas, C. W.; Smith, E. G.; Crear, B. J. & Kolkovski, S., 2004. Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture* 239: 351–373.
37. Robin, J. H., 1995. The importance of n-6 fatty acids in the culture of marine fish larvae. In: "Proceedings of the Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish" (Pittman, K.; Batty, R. S. & Verreth, J., eds.) vol. 201 pp. 106-111. Bergen, Norway.
38. Singh, R. K. & Khandagale, P. A., 2006. Optimal water characteristics for commercial production of cysts of the brine shrimp, *Artemia* in salt ponds. *Crustaceana* 79(8): 913-923.
39. Skjermoa, J. & Bergh, Ø., 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture* 238: 107– 113.
40. Sorgeloos, P.; Baeza-Mesa, M.; Claus, C.; Vandeputte, G.; Benijts, F.; Bossuyt, E.; Persoone, G. & Versichele, D., 1977. *Artemia salina* as life food in aquaculture. In: "Fundamental and applied research on the brine shrimp *Artemia salina* in Belgium. E.M.S. Spec. Publ. 2." (Persoone, G. & E. Jaspers, eds.) pp. 37-46. Universa Press, Wetteren, Belgium.
41. Sorgeloos, P., 1980. The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: "The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture"

- (Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O. & Jaspers, E., eds.), pp 25-46. Universa Press. Watermen, Belgium.
42. Sorgeloos, P.; Bossuyt, E.; Lavens, P.; Léger, P.; Vanhaecke, P. and Versichele, D., 1983. The use of brine shrimp *Artemia* in crustacean hatcheries and nurseries. *In: "CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture"* (McVey, J. P., ed), 1, pp. 71-96. Boca Raton, Florida, USA.
43. Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Léger, P.; Tackaert, W. & Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Faculty of Agriculture, 319pp.
44. Sorgeloos, P.; Léger, P.; Lavens, P. & Tackaert, W., 1987. Increased yields of marine fish and shrimp production through application of innovative techniques with *Artemia*. *Aquac. et Development-Cahiers Ethol. Appliquée*, 7:43-50.
45. Southgate, P.C.; Lou, Dong C., 1995. Improving the n-3 HUFA composition of *Artemia* using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture* 134 (1-2): 91-99.
46. Sorgeloos, P.; Dhert, P. & Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200:147–159.
47. Stappen, G.V., 1996. "Use of cysts". *In: "Manual on the production and use of live food for aquaculture"* (P. Lavens & P. Sorgeloos, eds), pp.107-136. FAO - Fisheries Technical Paper 361, Rome.
48. Stottrup, J. & Attramadal, Y., 1992. The influence of different rotifer and *Artemia* enrichment diets on growth, survival and pigmentation in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae". *Journal World Aquac. Soc.*, 23(4): 307-316.
49. Tuncer, H. ; Harrel, R.M. and Chai, T-J., 1993. Beneficial effects of n-3 HUFA enriched *Artemia* as food for larval palmetto bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*)." *Aquaculture* 110(108): 341-359.
50. Vanhaecke, P. & Sorgeloos, P., 1980. International Study of *Artemia* IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. *In: "The brine shrimp Artemia"* (Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O. A. & Jaspers, E., eds). 3 pp. 393-405. Universa Press, Wetteren, Belgium.
51. Vanhaecke, P. & Sorgeloos, P., 1983. International Study of *Artemia* XIX. The hatching data on 10 commercial sources of brine shrimp cysts and re-evaluation of the "hatching efficiency" concept. *Aquaculture*, 30 (1/4): 43-52.



52. Versichelle, D.; Leger, P.; Lavens, P. & Sorgeloos, P., 1986. L'utilisation d'Artemia. *In: Aquaculture*. Vol.1-Technique et Documentation, (Barnabé, G. ed.), pp. 239-257. Lavoisier. Paris.
53. Villalta, M.; Estévez, A. & Bransden, M. P., 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245: 193– 209.
54. Watanabe, T. ; Oowa, F.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 44 (10): 1115-1121.
55. Watanabe, T.; Ohta, M.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1982. Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 48 (12): 1775-1782.
56. Watanabe, T.; Tamiya, T.; Oka, A.; Hirata, M.; Kitajima, C. & Fujita, S., 1983. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 49(3): 471-479.
57. Wheeler, T.; Kitajima, C. & Fujita, S., 1979. Hatching events in the cysts of *Artemia salina*. *Aquaculture*, 18: 59-67.
58. Woods, C. M. C., 2003. Effects of varying Artemia enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* 220: 537–548.
59. Wu, Y-H & Chu, Y-N. 2007. Development of a self-cleaning rotating drum *Artemia* nauplii concentrator. *Aquacultural Engineering*. 36: 51–60.
60. Yúfera, M. & Pascual, E., 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina." *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.* 119 (29): 3-27.
61. Zmora, O. & Shpigel, M., 2006. Intensive mass production of Artemia in a recirculated system. *Aquaculture* 255: 488–494.

**ANEXO I****Solução de descapsulação**(segundo Sorgeloos *et al.*, 1983)

$$L = \frac{500 \times Ps}{[(3000 \times Ir) - 4003] \times Fd}$$

L= volume de lixívia em ml (NaOCl - 0,5g produto activo/g cistos)

Ps= peso de cistos a descapsular

Ir= índice de refração da lixívia

Fd= factor de diluição

H40 = volume em ml de NaOH a 40%

A35 =volume em ml de água salgada a 35 de salinidade

$$H40 = (0,33) \times Ps \quad A35 = 14 \times Ps - L - H40\%$$

Para a lixívia comercial que utilizamos:

Ir= 1,3438 para Fd=5,

o que corresponde a 142g.L<sup>-1</sup> de produto activo:

$$[(3000 \times 1,3438) - 4003] \times 5 = 142$$

Ex: Para descapsular 100g ou 150g de cistos, a solução de descapsulação é composta, respectivamente, por:

Volume de lixívia em mL:

$$\frac{500 \times 100}{142} = 352$$

$$\frac{500 \times 150}{142} = 528$$

Volume de NaOH em mL:

$$0,33 \times 100 = 33$$

$$0,33 \times 150 = 49,5$$

Volume de água salgada em mL:

$$14 \times 100 - 352 - 33 = 1015$$

$$14 \times 100 - 352 - 33 = 1015$$

Lixívia comercial - utilizando as indicações fornecidas pelos fabricantes:

Se o produto indicar a percentagem de actividade, poderemos utilizar esta indicação da seguinte forma:

- se tivermos 10% de produto activo teremos  $100\text{g.kg}^{-1}$  ou  $0,1\text{kg OCl}^{-1}.\text{L}^{-1}$  de cloro activo

Se o produto indicar os graus clorimétricos (gc) poderemos utilizar esta indicação da seguinte forma:

- se gc = 44° clorimétricos;

- se gc franceses =  $3,111 \times \% \text{ actividade}$  (onde graus clorimétricos / 3,111 = % de actividade), então teremos:

$$\frac{44}{3,111} = 14,15$$

14,15 % de produto activo =  $141,5\text{g.kg}^{-1}$  ou  $0,1415\text{kg OCl}^{-1}.\text{L}^{-1}$

O volume de lixívia a utilizar será  $0,5\text{g de OCl}^{-1}.\text{g}^{-1}$  cistos.

Para os 150g do exemplo anterior teremos  $0,5\text{g} \times 150\text{g} = 75\text{g}$  ou 75ml de produto activo que corresponde a:

$$\frac{75 \times 1000}{141,5} = 530\text{ml}$$

ou seja, 530ml de lixívia para 150g de cistos, sendo o restante procedimento igual ao descrito anteriormente.

## **Consideração final**

Verifica-se que, preze a grande evolução que tem existido nos últimos anos com a introdução de micro-alimentos, ainda não é possível prescindir do fornecimento de presas vivas às larvas dos peixes marinhos. A sua anatomia e o seu comportamento nos primeiros dias de vida dificilmente permitirão a curto prazo prescindir de alimentos vivos.

Existe deste modo, a necessidade de procurar alternativas – outros zooplanctontes como os copépodes – que permitam melhor perfil nutritivo e uma maior gama de dimensões, de novas metodologias de cultivo – como os mesocosmos – e, de outras fontes de lípidos e outros nutrientes, para enriquecimento do zooplankton, necessários às larvas de peixes marinhos.

Com a produção de novas espécies de peixes marinhos, novas exigências são colocadas quer em termos de qualidade quer de dimensão das presas. O que se tem avançado no cultivo da dourada e do robalo poderá permitir uma evolução mais rápida no cultivo das novas espécies com as devidas adaptações às suas necessidades específicas.

## Índice remissivo

ácidos gordos	2, 39, 130, 131, 172, 184	<i>Candida sp.</i>	114
acrílico	53	cartridge	57, 133
agentes patogénicos	188	casca	170, 176
agitador de tubos	43	cascas	179, 183
alimentação	112	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	37
amícticas	112	<i>Chaetoceros gracilis</i>	37
amónia	50	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	40
amoníaco	50	Chaetoceros sp.	102
antenas	176	Chlorella	38
antibióticos	132, 172, 189	<i>Chlorella autotrophica</i>	38
ar atmosférico	132	<i>Chlorella sp.</i>	40, 102, 103, 113, 115, 116, 120
arejamento	123, 132, 183, 184	<i>Chlorella stigmatophora</i>	38
<i>Artemia salina</i>	169	ciclo ameiótico	112
<i>Artemia sp.</i>	35	cilindros	55
<i>Artemia sp.</i>	108, 169, 170, 172, 190	cistos	171
assepsia	46	cistos	169
asséptica	44	cistos	178
autoclave	43	cistos	179
<i>Baccilariophyceae</i>	38	cistos	179
bactérias	48, 133, 183	cistos	180
balança	43	cistos	190
balão	41	Classe Baccilariophyceae	37
balões	43, 52, 53	Classe Chlorophyceae	37
batch	41	Classe Eustigmatophyceae	38
bexiga gasosa	132	classe Haptophyceae	37
bico de Bunzen	43, 47	Classe Prasinophyceae	37
bioencapsulação	2, 107, 130, 131, 132, 173, 184, 187	clones	115
bioencapsulados	110, 134	cloro	180, 182, 230
biomassa	174	clorofila	49
bissexual	170	CO <sub>2</sub>	49, 55
bloom	126	Colheita e utilização	124
blooms	35	concentrações	122
<i>Brachionus plicatilis</i>	35, 107, 109, 110, 113, 114, 129	contador de partículas	36
<i>Brachionus plicatilis</i>	107	contaminação	52
cadeia alimentar	190	contaminações	56
cadeia longa	184	copos graduados	43
caixa de Petri	44	corion	179
caixas de Petri	102	córion	112, 175, 179, 181, 183
caldeira	133	Coulter counter	36
caldeira de aquecimento	133	criptobiose	171
camãra de Burker	46	crustáceo branquiópode	169
camãra de contagem	36, 43, 46	cultivo	110
câmara de fluxo laminar	44	<i>Cultivo intensivo em grandes volumes</i>	118
câmara frigorífica	56	Culturas stock	116
		Culture Selco	114, 122, 123

curva de crescimento	52	<u>Fase estacionária</u>	45
Cyanophyceae	114	<u>Fase exponencial</u>	44
day-light	52	<u>fase lag</u>	44
densidade	112	fêmea amíctica	112
densidades	110, 182	fêmeas	115
desaceleração	48	fêmeas mícticas	113
descapsulação	179, 180, 181	fibra	43
desidratação	171	filtração	43, 131
desmineralizador	43	filtrador	109
destilador	43	filtros	57, 133
diapausa	112, 114, 169, 171	filtros de cartucho	133
diatomáceas	36, 37, 45, 113	fitoplâncton	120
Dicentrarchus labrax	1, 106	Flageladas	37
difusor	178	flutuabilidade	179
dióxido de carbono	54	fosfatos	45
doenças	179	fosfolípidos	172
dourada	1, 35, 106, 107, 111	fotoperíodo	49, 52
<i>Dunaliella salina</i>	38	fotossíntese	52
<i>Dunaliella</i> sp	102	fototropismo	182
<i>Dunaliella</i> sp.	115	funis	43
<i>Dunaliella tertioleta</i>	38, 40, 113	gástrulas	171
eclosão	112, 178	gema de ovo	131
eclosões graduais	114	glândulas	170
eficiência de eclosão	174	glicerol	175, 184
electrobomba	43, 57, 133	glicogénio	179
embrião	175	gordura	132
emulsionante	131	graus clorimétricos	230
emulsões	131, 184	Great Salt Lake	173
endógena	112	grow-lux	52
enriquecimento	2, 131, 134	<i>Haptophyceae</i>	38
enzima	178	hematina	171
equipamento	43	hematocítómetro	36, 43, 46, 105
Erlenmeyer	116	<i>Hexarthra fennica</i>	109
Erlenmeyers	43, 52, 55	hidratação	172
espinho gnatobasal	177	highly unsaturated fatty acids	37
esterilização	43, 47	hipersalinos	108
estirpe	169	hipoclorito	182
estirpes	44, 111, 116, 172, 178, 185	hipoclorito de sódio	54, 178, 180
estufa	43	HUFA	37, 38, 172, 173
eurihalina	107	incubação	178, 182
eurihalino	108	incubar	182
<i>Eustigmatophyceae</i>	38	Índice	1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18
exógena	106, 108	índice de refracção	229
exotérmica	180	inoculação	118
fase de declínio	48	inóculo	35, 46, 53, 100, 115, 116
<u>Fase de decréscimo ou declínio</u>	45	inóculos	41, 44, 45, 48, 57
<u>Fase de latência</u>	44	instar	174, 176, 177, 184
fase estacionária	131		

intensidade luminosa	52	MINERAIS	96
irradiadores	133	<i>Monochrysis sp.</i>	115
<i>Isochrysis galbana</i>	40	<i>Nannochloris maculata</i>	38
<i>Isochrysis aff. galbana</i>	37	<i>Nannochloris sp.</i>	115
<i>Isochrysis galbana</i>	37, 38	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	38
<i>Isochrysis sp.</i>	102, 115	<i>Nannochloropsis oculata</i>	38
<i>lag</i>	48	<i>Nannochloropsis sp.</i>	38, 40, 102, 103, 113, 115
lagos salgados	169	náuplios	108, 174, 182, 184, 190
lâmpadas	41, 43, 44, 52, 57	neutralizar	180
larva	172	Nitrato	100
larvas	107, 110, 187	nutrientes	35, 50, 52
latência	48	obscuridade	114
lava pés	57	<i>o-tolidina</i>	54
lavagem	131, 134	oviparidade	170
lecitina de ovo	131	ovos	112, 114, 169
lecitina de soja	131	ovos de resistência	114
levedura	109, 114, 120, 122, 130, 131, 186	ovos haplóides	112
leveduras	114	ovoviviparidade	170
linguado	1, 106	oxidação	180
lípidos	132, 184	oxigênio	121
lipoproteica	170	parasitas	188
lixívia	57, 181, 229, 230	partenogenética	112
lux	46, 52, 178	partenogenética	170
manga	41	<i>Pavlova lutheri</i>	37
mangas	43, 53, 55	percentagem de eclosão	174
mangas de polietileno	55	perfil nutritivo	189
matéria em suspensão	133	peso seco	174
maternidades	1	pesticidas	179
meio de cultura	52	pH	55
meio de Walne	45, 48, 102	<i>Phaeodactylum sp.</i>	102, 114, 115
<b>meio líquido</b>	45	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	37, 40
meio sólido	44, 48	pipetas	43
meiose	112	pipetas de Pasteur	43
membrana cuticular	176	placa de aquecimento	43
membrana embrionária	176, 179	placas de Petri	48
membranas	172	<i>Platymonas suecica</i>	113
metabolitos	178	poli-insaturados	172
Metais	179	poli-insaturados	130
metanáuplios	173	polimorfismo	169
método descontínuo	117	polinsaturados	184
<b>Método semi-contínuo</b>	117	Polyunsaturated fatty acids	37
método semi-descontínuo	118	porosidades	133
metodologia de produção	126	Posição sistemática	108
microalga	47, 118, 131	pré-emergência	176
microalgas	35, 36, 48, 49, 114, 116	presas	106, 188
microcápsulas	131	pressão osmótica	175
micronutriente	50	produção	41, 120, 126, 190
microscópio	43		

protozoários	48	<i>Skeletonema costatum</i>	37, 40
provetas	43	<i>Skeletonema</i> sp.	102
PUFA	37, 130	<i>Solea senegalensis</i>	1, 106
purga	123, 183	Soluções inóculo	98, 100
purgas	132	<i>Sparus aurata</i>	1, 106
recém-eclodidos	183	substâncias tóxicas	179
reticula micrométrica	43	suspensão	190
rede	191	tanques	178
rehidratação	169	taxonomicamente	169
remoção	178	taxonómico	170
rendimento da eclosão	174	temperatura	52, 112, 121, 160, 178
repicagem	102	tempo de incubação	174
repicagens	45, 48	tempo de latência	114
reprodução	112	termostato	133
reprodução partenogénica	115	<i>Tetraselmis</i> sp.	102, 115
reservas vitelinas	176	<i>Tetraselmis suecica</i>	40, 104, 116
resistências	133	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	37, 40, 104
robalo	1, 106	<i>Thalassiosira</i> sp.	102
rolhas de borracha	43	tiosulfato de sódio	54, 180
rotífero	107	TRIS	99
rotíferos	35, 53, 109, 110, 114, 115, 116, 118, 121, 123, 126, 131	tubos	43
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	110, 114, 119	tubos de ensaio	44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120	tubos de PVC	53
sais	45, 98	ultravioleta	44
SAIS	96	ultra-violeta	191
sala de produção	57	ultra-violetas	57, 133
salinas	169	Utah	173
salinidade	52, 120	utilização	124
salmoura	181	Vidraria	43
<i>Schzothrix</i>	114	vitamina B12	119, 120
sedas	177	vitaminas	45, 46, 52, 96, 98, 172, 189
semi-contínuo	117	vitelinas	108
silicatos	45	zooplâncton	107
sincronismo	114, 174	zootécnicos	115
sistemática	169		