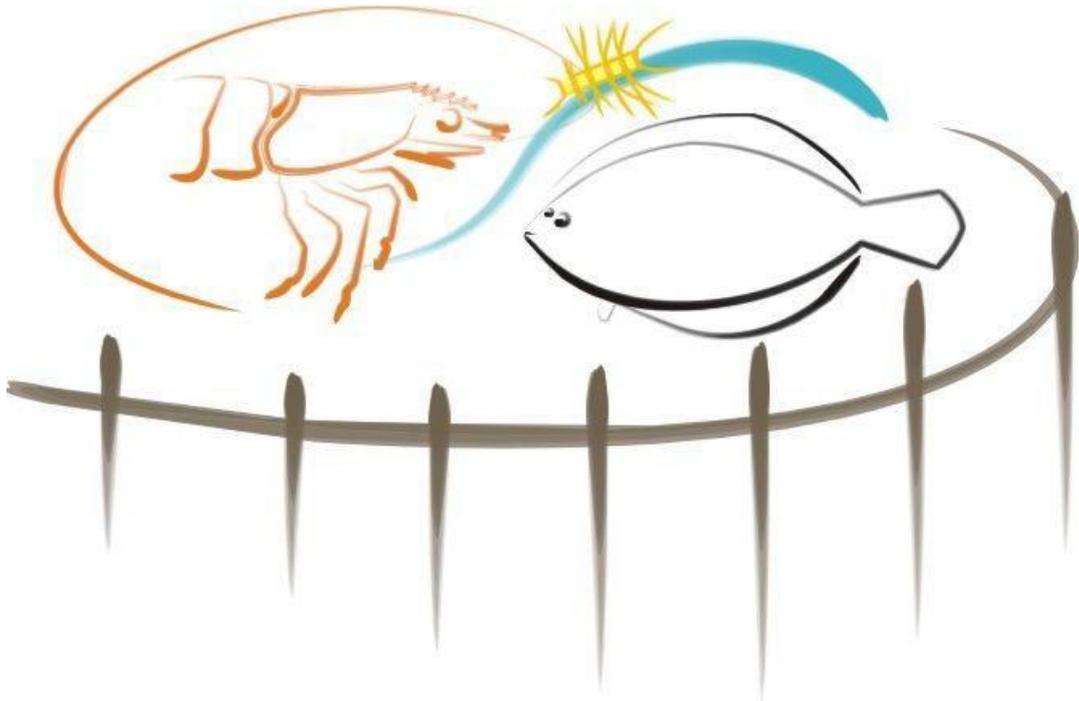




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



EFEITO DA DIETA NA QUALIDADE
DE PÓS-LARVAS DO CAMARÃO-BRANCO *Litopenaeus vannamei* PRODUZIDAS
EM SISTEMAS DE BIOFLOCOS (BOONE, 1931)

SABRINA MEDEIROS SUITA

FURG
RIO GRANDE, RS
2015

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura
Tese de Doutorado

**Efeito da dieta na qualidade de pós-larvas do camarão-branco
Litopenaeus vannamei produzidas em sistemas de bioflocos (Boone,
1931).**

SABRINA MEDEIROS SUITA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
doutor em Aquicultura no Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo C. Abreu

Rio Grande – RS – Brasil

Junho, 2015

25	AGRADECIMENTOS	6
26	RESUMO GERAL	7
27	ABSTRACT.....	10
28	INTRODUÇÃO GERAL	12
29	A CARCINOCULTURA NO MUNDO	13
30	LARVICULTURA E PRÉ-BERÇÁRIO	15
31	O HEPATOPÂNCREAS	21
32	ALIMENTAÇÃO NAS FASES INICIAIS DE VIDA	24
33	A REDUÇÃO DAS TAXAS DE RENOVAÇÃO DE ÁGUA	28
34	ISÓTOPOS ESTÁVEIS.....	31
35	JUSTIFICATIVA.....	35
36	OBJETIVO.....	36
37	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
38	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
39	CAPÍTULO I- Desenvolvimento do hepatopâncreas e análise de qualidade de pós-	
40	larvas do camarão-branco do Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> produzidas em	
41	sistemas de boflocos	48
42	RESUMO	49
43	ABSTRACT.....	52
44	INTRODUCTION	53
45	METHODOLOGY.....	55
46	Acquiring shrimp.....	55
47	Experimental design	55
48	Water Treatment and Physicochemical and Biological parameters	55
49	Food, water renewal and organic fertilizations	56
50	Performance and quality analysis of post-larvae.....	57
51	Morphometric analysis of the hepatopâncreas	58
52	Statistical tests	58
53	RESULTS	58
54	Water Quality	58
55	Performance and Analysis of quality of the post-larvae	60
56	Morphometric analysis of the Hepatopancreas	62
57	DISCUSSION	67

58	CONCLUSIONS.....	71
59	ACKNOWLEDGEMENTS.....	72
60	REFERENCES.....	72
61	CAPÍTULO II- Contribuição dos bioflocos para a produção de pós-larvas de	
62	<i>Litopenaeus vannamei</i> determinada por isótopos estáveis.....	78
63	RESUMO.....	79
64	ABSTRACT.....	82
65	INTRODUCTION.....	83
66	MATERIAL AND METHODS.....	85
67	Biological material.....	85
68	Experimental design.....	85
69	Water treatment and Physical - Chemical Parameters.....	86
70	Characterization of Bioflocs.....	87
71	Post-larvae quality analysis.....	87
72	Stable Isotopes analysis.....	88
73	Statistical Analysis.....	89
74	RESULTS.....	90
75	Water quality.....	90
76	Post-larvae growth performance and quality.....	91
77	Microbial community.....	92
78	Stable isotopes.....	94
79	DISCUSSION.....	100
80	CONCLUSIONS.....	106
81	ACKNOWLEDGEMENTS.....	106
82	REFERENCES.....	107
83	CAPÍTULO III- Produção de pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistemas de	
84	bioflocos em diferentes regimes de alimentação.....	113
85	RESUMO.....	114
86	INTRODUÇÃO.....	116
87	MATERIAL E MÉTODOS.....	118
88	Obtenção dos animais.....	118
89	Delineamento experimental.....	118
90	Tratamento da água e Parâmetros Físicos e Químicos.....	120
91	Caracterização dos bioflocos.....	121

92	Análises morfométrias do hepatopâncreas	121
93	Análise de isótopos estáveis	121
94	Testes Estatísticos.....	122
95	RESULTADOS.....	123
96	Qualidade da água	123
97	Desempenho zootécnico.....	126
98	Análises Histológicas	126
99	Microrganismos	128
100	Isótopos Estáveis	129
101	DISCUSSÃO	132
102	CONCLUSÕES	136
103	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
104	CAPÍTULO IV- Efeito de diferentes fontes de alimento no pré-berçário de	
105	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931).....	142
106	RESUMO	143
107	INTRODUÇÃO	145
108	MATERIAL E MÉTODOS	146
109	Obtenção dos animais.....	146
110	Delineamento experimental.....	146
111	Tratamento da água e Parâmetros Físicos e Químicos.....	148
112	Análises morfométricas do hepatopâncreas	148
113	Análise de isótopos estáveis	149
114	Testes Estatísticos.....	150
115	RESULTADOS.....	150
116	Qualidade da água	150
117	Desempenho zootécnico	151
118	Análises Histológicas	152
119	DISCUSSÃO	155
120	CONCLUSÕES	161
121	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161
122	DISCUSSÃO GERAL	167
123	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
124	CONCLUSÕES GERAIS.....	172
125		

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148 *Dedico este trabalho à minha família por todo incentivo e apoio.*

149

150

151 *Agradecimentos*

152 São poucas as linhas reservadas neste trabalho para agradecer, porém a gratidão às
153 muitas pessoas que contribuíram com esta jornada é imensa.

154 Gostaria de agradecer ao meu orientador, Wilson Wasielesky Jr., pelos ensinamentos,
155 incentivo, auxílio e compreensão ao longo destes quatro anos de trabalho. Ao meu co-
156 orientador, Paulo C. Abreu, pela disponibilidade, sugestões e ensinamentos essenciais
157 no decorrer deste percurso.

158 Ao professor Kleber Miranda Filho, Geraldo Fóes, Dariano Krummenauer e Plínio
159 Furtado pelas correções e sugestões feitas na presente Tese.

160 Ao colega Alessandro Cardozo pela parceria e contribuição em todos os momentos
161 deste doutorado. Aos colegas Diogo Lopes e André Braga por todo auxílio na etapa
162 experimental e pelas muitas e divertidas madrugadas de trabalho na larvicultura da
163 EMA. As colegas Tatiana Martins e Mercia Silva pelo suporte em muitos trabalhos.

164 Ao professor Luis Alberto Romano a amiga Marta, pelos ensinamentos e toda ajuda nas
165 análises histológicas.

166 Ao professor Eduardo Ballester, por me ensinar muito sobre o trabalho com larvicultura
167 de camarões.

168 Aos funcionários da Estação Marinha de Aquicultura, especialmente ao “Seu” Hermes,
169 Sandro e Anderson.

170 A toda equipe de professores e colegas do Projeto Camarão pela capacidade de trabalho
171 em equipe.

172 Aos muitos colegas e amigos que em algum momento contribuíram com este trabalho e
173 tornaram meus dias mais agradáveis na EMA.

174 Ao Augusto Costa por estar sempre presente, participando, sugerindo e apoiando desde
175 o início desta jornada. Agradeço a toda sua dedicação, carinho e companheirismo.

176 Aos meus pais e irmãos pelo apoio e incentivo, fundamentais nesta etapa.

177 Muito obrigada!

178 **RESUMO GERAL**

179 A presente Tese teve como objetivo determinar a influência dos bioflocos
180 (flocos microbianos) e de diferentes fontes de alimentos no desenvolvimento de pós-
181 larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei* entre as fases de PL₁ e PL₃₀, através de
182 indicadores de qualidade das larvas, técnicas histológicas para avaliação do
183 hepatopâncreas e a técnica de isótopos estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Esta Tese está
184 estruturada na forma uma introdução geral, com levantamento bibliográfico sobre as
185 fases iniciais de vida de camarões peneideos, além de critérios para verificação de
186 consumo alimentar e avaliação de qualidade pós-larval e seus possíveis métodos de
187 análise e quatro capítulos, além de discussão geral e conclusões finais. No capítulo I
188 foram realizados dois experimentos com pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, o
189 primeiro experimento testou pós-larvas entre as fases de PL₁ e PL₁₅ e o segundo
190 experimento pós-larvas entre as fases de PL₁₆ e PL₃₀, ambos com dois tratamentos
191 (bioflocos vs. água clara), comparados utilizando técnicas histológicas para avaliação do
192 hepatopâncreas e critérios de qualidade previamente selecionados. Os resultados deste
193 capítulo demonstraram que a produção de pós-larvas em meio à bioflocos resulta em
194 organismos com melhor qualidade final e melhor desenvolvimento do hepatopâncreas e
195 com maior presença de células digestivas, quando comparados aos cultivados em água
196 clara. O capítulo II caracteriza a comunidade microbiana dos tratamentos testados
197 (bioflocos vs. água clara) e utiliza a técnica de isótopos estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, para
198 determinar a influência dos bioflocos, dos diferentes tipos de ração, de *Artemia* sp. e da
199 microalga *Chaetoceros muelleri* no crescimento das pós-larvas. Estes resultados nos
200 permitiram observar que, ao final do período experimental, os bioflocos são constituídos
201 principalmente por protozoários e microalgas, e no sistema de bioflocos, as microalgas
202 são mantidas sem necessidade de inoculações após o décimo dia, continuando a

203 contribuir como fonte alimentar, pois embora pós-larvas assimilem em maior parte a
204 ração específica para berçário, elas são capazes de consumir e incorporar os bioflocos
205 aos seus tecidos. Nos capítulos III e IV foi utilizada a técnica de isótopos estáveis e a
206 análise histológica do hepatopâncreas como ferramentas para análise de contribuição de
207 diferentes fontes de alimento para o crescimento e status nutricional de pós-larvas de
208 *Litopenaeus vannamei*, sendo o experimento do capítulo IV desenvolvido em meio à
209 bioflocos e sem renovação de água e o experimento apresentado no capítulo V
210 desenvolvido em meio à água clara com renovação de água. As fontes alimentares
211 fornecidas foram *Chaetoceros muelleri*, *Artemia* sp. e ração comercial específica para
212 berçário de camarões. No decorrer de ambos os experimentos foi detectado a
213 colonização das paredes dos tanques por um biofilme, o qual foi considerado como
214 fonte de alimento. No experimento do capítulo III verificou-se que a ração comercial
215 contribuiu com uma maior parcela do crescimento de pós-larvas de *L. vannamei*,
216 entretanto foi observada uma contribuição substancial dos bioflocos para o crescimento
217 dos animais. O biofilme também contribuiu como fonte alimentar e, em conjunto com o
218 biofoco, contribuiu na manutenção da qualidade da água. De acordo com os resultados
219 das análises do hepatopâncreas e isótopos estáveis, pode-se concluir que os bioflocos e
220 a microalga *C. muelleri* podem ser utilizados em substituição a *Artemia* sp., uma vez
221 que ambas as fontes proporcionam que sejam produzidos organismos com boas
222 características histológicas do hepatopâncreas, além de não necessitar de inoculações
223 sucessivas ao longo do tempo. No experimento do capítulo IV verificou-se que houve
224 assimilação do biofilme pelas pós-larvas, porém a assimilação do mesmo não foi eficaz
225 para melhorar o desempenho e garantir a qualidade da água. A *Artemia* sp. apresentou-
226 se como a fonte de alimento vivo mais eficaz para a qualidade nutricional de pós-larvas
227 e seu fornecimento não deve ser substituído por *C. muelleri* durante a fase de berçário

228 em meio a água clara. A partir dos resultados da presente tese pode-se concluir que a
229 suspensão das renovações de água não gera prejuízos para a produção de pós-larvas de
230 *Litopenaeus vannamei* podendo-se iniciar a produção em sistemas de bioflocos já desde
231 a fase de PL₁. Neste tipo de sistema as pós-larvas consomem e incorporam os bioflocos
232 aos seus tecidos, além de apresentarem melhor padrão de qualidade do que aquelas
233 produzidas em sistemas tradicionais. Em sistemas de bioflocos a oferta de *Artemia* sp.
234 como fonte de alimento pode ser substituída com sucesso pela microalga *C. muelleri*.

235 **Palavras-chave:** Berçário, Bioflocos, Camarão, Hepatopâncreas, Isótopos Estáveis

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247 **ABSTRACT**

248 The aimed of this thesis was to determine the influence of bioflocs and different
249 food sources in the development of *Litopenaeus vannamei* post-larvae from PL₁ to PL₃₀,
250 using pre-selected quality indicators analyzes, histological techniques to evaluate the
251 hepatopancreas and the stable isotopes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ technique. This thesis is
252 structured in a general introduction with literature about the early life stages of penaeid
253 shrimp, and criteria to evaluation of food consumption, quality and analysis methods of
254 post-larval, general discussion and conclusions and four chapters. In Chapter I were
255 conducted two trials with *Litopenaeus vannamei* post-larvae, the first trial tested post-
256 larvae from PL₁ to PL₁₅ and the second trial from PL₁₆ to PL₃₀ post-larvae, in both two
257 treatments were compared (bioflocs vs. clear water) using histological techniques to
258 evaluate the hepatopancreas and previously selected quality criteria. The results of this
259 section show that the production of post-larvae in bioflocs system results in organisms
260 with better final quality score and better development of the hepatopancreas with more
261 digestive cells as compared with cultured in clear water. The Chapter II characterizes
262 the microbial community in the tested treatments (bioflocs vs. clear water) and uses the
263 stable isotopes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ technique, to determine the influence of bioflocs,
264 different types of feed, *Artemia* sp. and *Chaetoceros muelleri* in the post-larval growth.
265 These results enable us to observe that at the end of the trial period the bioflocs are
266 mainly protozoa and microalgae, and in the bioflocs system the microalgae are kept
267 without inoculations after the tenth day, continuing to contribute as a food source, for
268 even if the post-larvae assimilate more specific feed for nursery, they are able to
269 consume and to incorporate bioflocs in their tissues. The III and IV Chapters was used
270 the stable isotopes technique and histological analysis of the hepatopancreas as tools for
271 contribution analysis of different food sources for growth and nutritional status of

272 *Litopenaeus vannamei* post-larvae, in the Chapter III the trial was carried with bioflocs
273 systems and no exchanging water and the trial presented in the IV chapter was carried
274 with clear water with exchanging water. Food sources provided were *Chaetoceros*
275 *muelleri*, *Artemia* sp. and commercial feed specific to shrimp nursery. During the trials
276 was observed the colonization of the walls of the tanks by a biofilm, which was included
277 as a food source. In the III Chapter the trial that the commercial diet contributes a
278 greater proportion to the growth of *L. vannamei* post-larvae, however it was observed a
279 substantial bioflocs contribution to the growth of animals. The biofilm as a food source
280 and the bioflocs, contributed in maintaining water quality. According to the results of
281 the hepatopancreas analysis and the stable isotopes, it can be concluded that in the
282 bioflocs systems the *C. muelleri* can replace *Artemia* sp., because even though both
283 sources generate good hepatopancreas histological features, the *C. muelleri* does not
284 require successive inoculations over time. In the IV Chapter the trial that the biofilm
285 was assimilated by post-larvae, but was not effective to improve performance and
286 ensure the quality of the water. The *Artemia* sp. was the live food source more effective
287 for the nutritional quality of post-larvae and should not be replaced by *C. muelleri*
288 during the nursery phase amid clear water. The results of this thesis concluded that the
289 no exchange water doesn't affect the production of *Litopenaeus vannamei* post-larvae,
290 it's possible to start production in bioflocs systems since the PL₁ stage. The post-larvae
291 consume and incorporate the bioflocs in their tissues, in addition to having better quality
292 standard than those produced in traditional systems. In bioflocs systems the supply of
293 *Artemia* sp. can be replaced by microalgae *C. muelleri* as a food source.

294 **Keywords:** Bioflocs, Hepatopancreas, Nursery, Shrimp, Stable Isotopes.

295

296

INTRODUÇÃO GERAL

297

298

299

300

301

Sabrina Medeiros Suito

302

Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

303

Cx. Postal 474, CEP:96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

304

smsuito@yahoo.com.br

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317 **A CARCINOCULTURA NO MUNDO**

318 A primeira produção de larvas em laboratório no mundo é datada da década de
319 30, no Japão, porém a produção em laboratórios especializados adquiriu caráter
320 comercial apenas após a década 70, devido à necessidade de cumprir com uma demanda
321 de mercado oriunda da expansão da carcinocultura mundial. A implantação destes
322 laboratórios representou uma transformação importante para o cenário da carcinocultura
323 mundial, oferecendo maior biossegurança e tecnologia, tendo em vista que há algumas
324 décadas, pós-larvas não eram produzidas em laboratórios, e sim capturadas
325 diretamente no ambiente (Nunes *et al.* 2011).

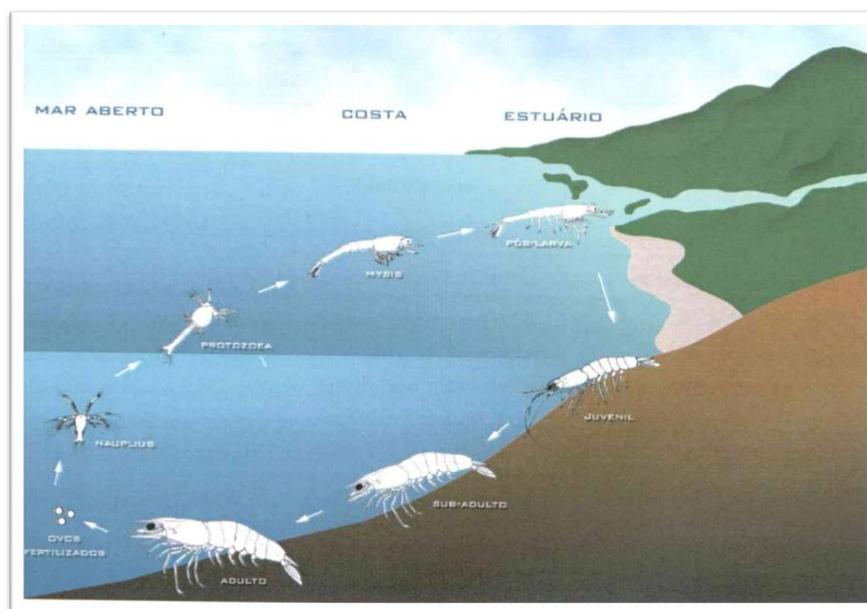
326 Desta forma, atualmente, há um esforço para utilização de práticas responsáveis
327 para o desenvolvimento de uma carcinocultura que cumpra com a demanda de mercado,
328 porém de maneira sustentável, com elaboração de códigos de Conduta e Boas Práticas
329 de Manejo visando uma produção viável economicamente e ambientalmente amigável
330 (Boyd 2003). O Brasil possui cerca de trinta laboratórios especializados em larvicultura
331 de camarões marinhos, com capacidade de produção de aproximadamente dois milhões
332 de pós-larvas/mês, com dominância da espécie *Litopenaeus vannamei* (Rocha *et al.*
333 2013).

334 Tomando como exemplo os diversos avanços tecnológicos obtidos pela
335 carcinocultura, a utilização de berçários para pós-larvas antecedendo o período de
336 engorda tem sido amplamente estudado, considerando uma gama de aspectos para
337 diferentes espécies de camarões peneídeos como *Farfantepenaeus brasiliensis* (Beserra
338 da Silva *et al.* 2012, Emerenciano *et al.* 2012, Lopes *et al.* 2012, Souza *et al.* 2012),
339 *Farfantepenaeus paulensis* (Soares *et al.* 2006, Abreu *et al.* 2007, Ballester *et al.* 2007,
340 Emerenciano *et al.* 2011), *Penaeus monodon* (Arnold *et al.* 2006), *Litopenaeus*

341 *setiferus* (Brito *et al.* 2000, 2004) e *Litopenaeus vannamei* (Brito *et al.* 2004, Jiménez-
342 Yan *et al.* 2006, Gamboa-Delgado & Le Vay 2009, Suita *et al.* 2015a).

343 O camarão-branco *Litopenaeus vannamei* é o camarão marinho mais estudado e
344 representativo para a carcinocultura mundial (FAO 2012). Esta espécie é nativa do
345 Oceano Pacífico, porém produzida como espécie exótica em diversos países, isto porque
346 apresenta boa adaptação às variações ambientais (Barbieri Jr. & Ostrensky Neto 2001).
347 Devido ao interesse econômico por esta espécie, existe, atualmente, um grande
348 conhecimento a respeito de suas características e exigências e desta forma, há um pacote
349 tecnológico desenvolvido para suas necessidades desde as fases iniciais de vida, o que
350 permite que esta espécie seja produzida com ótimos resultados de desempenho de
351 crescimento, uniformidade de tamanho e sobrevivência (FAO 2004).

352 Embora esta espécie tolere amplas variações de salinidade, suas fases larvais são
353 predominantemente marinhas, necessitando salinidades elevadas para sobrevivência
354 (FAO 2004). Na Figura 1 são apresentadas as diferentes fases do ciclo de vida de
355 camarões marinhos, os quais possuem reprodução e estágios larvais essencialmente
356 marinhos e, ao atingir a fase de pós-larva, deslocam-se para zonas costeiras estuarinas
357 onde crescem abrigados e com alimentação abundante, à medida que adquirem
358 maturidade sexual migram novamente para áreas oceânicas onde se reproduzem e
359 reiniciam o ciclo (Barbieri Jr. & Ostrensky Neto 2001).



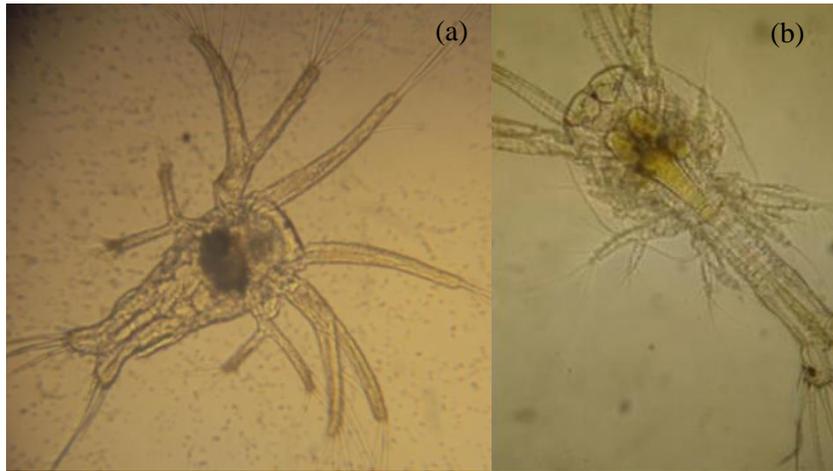
360

361 Figura 1- Desenho esquemático de ciclo de vida de camarões peneídeos (Fonte:
 362 www.google.com.br)

363 **LARVICULTURA E PRÉ-BERÇÁRIO**

364 Os camarões peneídeos eclodem na forma de pequenas larvas denominadas de
 365 náuplios, o processo de larvicultura é compreendido por estágios que se distinguem em
 366 subfases e são caracterizadas por bruscas modificações morfológicas.

367 De acordo com critérios de identificação propostos por Barbieri Jr. & Ostrensky
 368 Neto (2001) e Kitani (1986), as larvas assim que eclodem dos ovos são denominadas de
 369 Náuplios I e em aproximadamente 30 horas, mantida a temperatura ideal para o
 370 desenvolvimento, alcança o último estágio naupliar, denominado Náuplio V (Figura 2
 371 a). Estas larvas utilizam apenas reservas vitelínicas como recurso energético, pois o
 372 primeiro indício do sistema digestório ocorre na fase de Náuplio V, com a formação da
 373 mandíbula. Os estágios seguintes são Protozoa ou Zoa, subdivididas em Protozoa I
 374 (Figura 2b), II (Figura 2c) e III (Figura 2d), caracterizadas pela diferenciação entre tórax
 375 e abdômen, formação de olhos pedunculados, desenvolvimento do trato digestivo,
 376 somitos abdominais e urópodos (Kitani 1986).



377



378

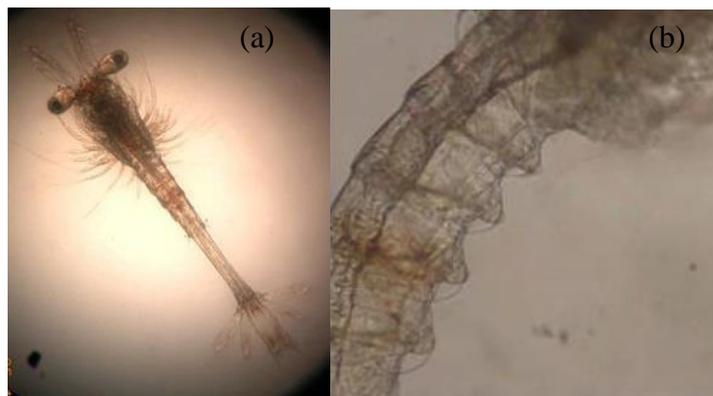
379 Figura 2- Diferentes estágios larvais de *Litopenaeus vannamei*, onde (a) Náuplio V
380 apresentando reservas vitelínicas, (b) Protozoa I com olhos ainda não separados, (c)
381 Protozoa II com olhos pedunculados e (d) Protozoa III com urópodos e cordão fecal.

382 O último estágio larval é o de Misis, subdividido em Misis I (Figura 3a), II
383 (Figura 3b) e III (Figura 3c), com aparecimento dos pleópodos e telson. O estágio
384 seguinte, é denominado de pós-larva 1 ou PL₁ (Figura 3d), correspondente a um dia
385 como pós-larva, e assim sucessivamente. Nesta fase ocorre a formação do rosto, dos
386 espinhos dorsais e segmentos abdominais (Kitani 1986).

387

388

389



390



391



392 Figura 3- Formação dos pleópodos em *Litopenaeus vannamei*, onde (a) Mysis em corpo
393 total (b) Mysis I apresentando os primórdios dos pleópodos, (c) Mysis II com pleópodos
394 mais desenvolvidos, (d) Mysis III pleópodos segmentados e (e) Pós-larva (PL₁) com
395 pleópodos funcionais.

396 Não existe uma diferenciação clara sobre quando os camarões deixam de ser
397 considerados como pós-larvas e começam a ser considerados como juvenis, porém em
398 termos gerais, costuma-se denominar como larvicultura, o sistema que mantém os

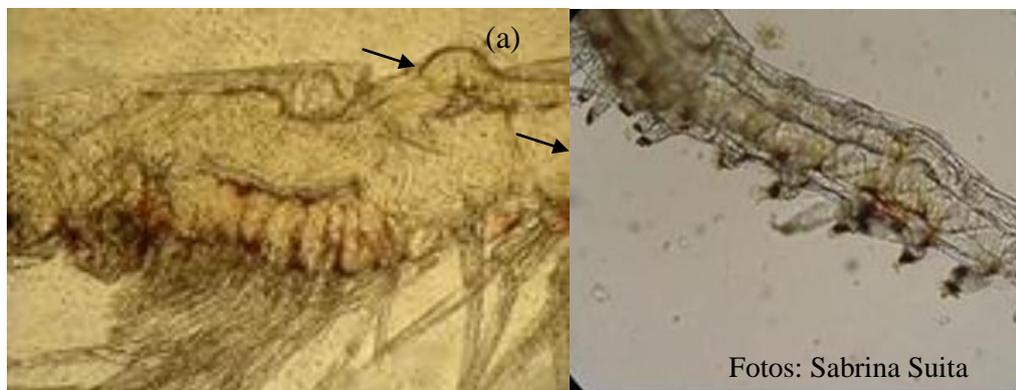
399 animais até o estágio de PL₁₀₋₁₅, já que após este período possuem todas as lamelas
400 branquiais ramificadas e, desta forma, aptos para mudanças de salinidade (FAO 2004).

401 A etapa que sucede a larvicultura é denominada de pré-berçário ou berçário.
402 Estes sistemas são caracterizados por altas densidades de estocagem, elevadas taxas de
403 renovação de água e adição de alimentos de ótima qualidade (ABCC 2005). De acordo
404 com Samocha *et al.* (2007) é recomendado que pós-larvas permaneçam em sistemas de
405 berçário até completar 1,0g, possibilitando um menor tempo de permanência destes
406 camarões nos viveiros de engorda, aumentando, desta forma, a produção por unidade de
407 área e disponibilizando organismos mais resistentes e de melhor qualidade para esta
408 fase (FAO 2004, Moss & Moss 2004, Suita *et al.* 2015a).

409 Conforme recomendações da FAO (2004), um ambiente de produção de larvas e
410 pós-larvas de camarões deve cumprir pré-requisitos, tais como a presença de instalações
411 com infraestrutura adequada, biossegurança, uso responsável da água e seus produtos
412 para tratamento da mesma, além de garantir um estado sanitário adequado, garantido
413 por critérios de qualidade que devem ser avaliados periodicamente. Isto permite um
414 conhecimento sobre o estado fisiológico no qual os animais se encontram, uma vez que
415 a qualidade das pós-larvas ao sair do berçário terá influência no sucesso da engorda
416 (Barbieri Jr. & Ostrensky Neto 2001, FAO 2004). Além das avaliações de crescimento e
417 sobrevivência, no âmbito comercial a avaliação mais rotineira é o teste de stress
418 ambiental, para variações salinidade (Samocha *et al.* 1998, FAO 2004, Palacios &
419 Racotta 2007), temperatura (Wang & Chen 2006) e amônia (Racotta *et al.* 2004).

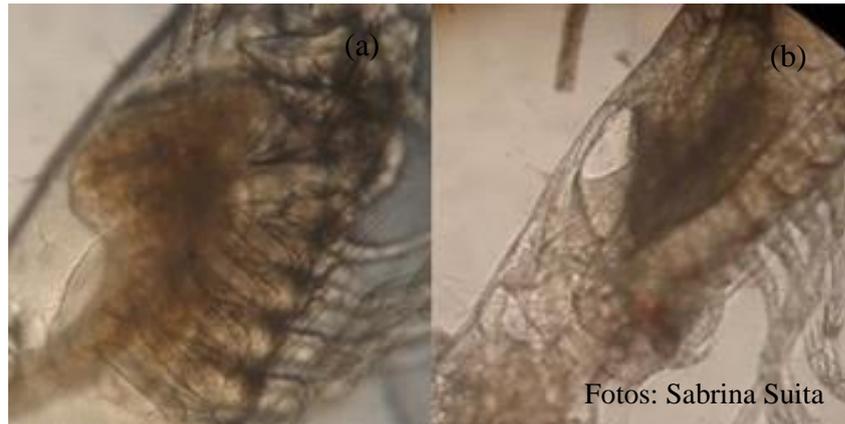
420 Além destes testes, na literatura é possível encontrar alguns modelos de
421 avaliação de larvas e pós-larvas de camarões marinhos e de água doce, os quais
422 pontuam critérios importantes e a partir de uma pontuação final, fornecem uma
423 informação sobre a qualidade do lote. Os critérios mais relevantes encontrados nestes

424 modelos são: cor do músculo abdominal (Figura 4a) (Tayamen & Brown 1999, FAO
425 2004, Suita *et al.* 2015a), presença de deformidades no corpo (Figura 4b) (FAO 2004,
426 Lopes *et al.* 2012), presença de necroses (Figura 4c) (FAO 2004, Lopes *et al.* 2012,
427 Suita *et al.* 2015a), preenchimento e coloração do hepatopâncreas (Tayamen & Brown
428 1999, FAO 2004, Lopes *et al.* 2012, Suita *et al.* 2015a) (Figura 5a e b), aparência
429 microscópica dos túbulos do hepatopâncreas (Figuras 6 a e 6b) (Suita *et al.* 2015a),
430 aparência histológica dos túbulos do hepatopâncreas (FAO 2013, Suita *et al.* 2015a),
431 peristaltismo intestinal (Figura 7a), proporção músculo:intestino (Figura 7b), presença
432 de “*fouling*” epibionte (Figura 8), desenvolvimento branquial (Figura 9) (Lopes *et al.*
433 2012), e atividade natatória (Tayamen & Brown 1999, FAO 2004). Todos os modelos
434 encontrados na literatura e em práticas de rotinas em laboratório envolvem análises do
435 hepatopâncreas como um dos critérios principais de análise de qualidade e consumo de
436 alimento.



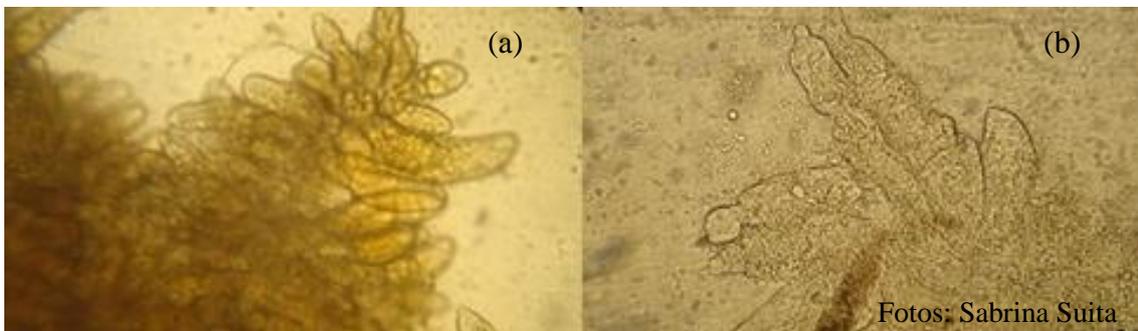
437

438 Figura 4- Pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, onde (a) PL com trato digestivo vazio e
439 com deformidades no intestino (b) PL com necroses severas em todos os apêndices.



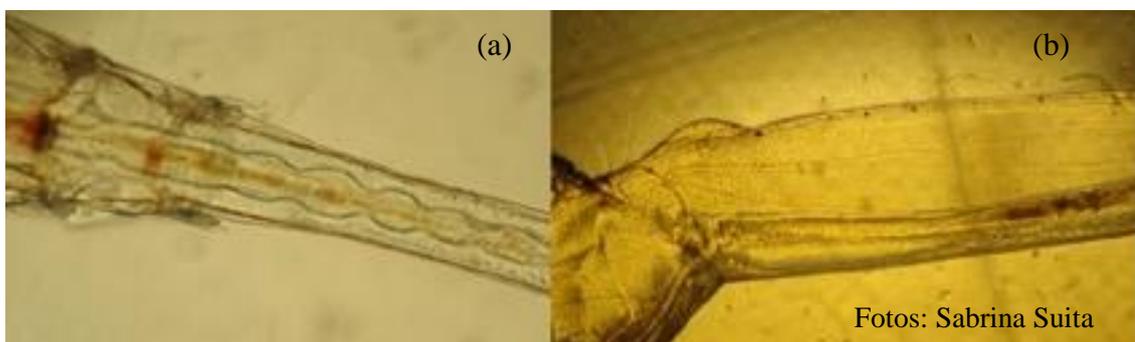
440

441 Figura 5- Pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, onde (a) PL com hepatopâncreas cheio
442 de reservas (b) PL com trato digestivo apresentando quantidade reduzida de reservas.



443

444 Figura 6- Túbulos do hepatopâncreas de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, onde (a)
445 túbulos sem deformidades e com reservas (b) túbulos com deformidades nas bordas e
446 apresentando pouca reserva de alimento.



447

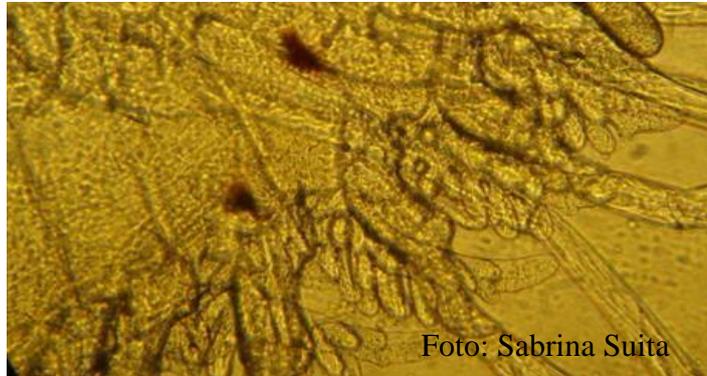
448 Figura 7- Intestino de *Litopenaeus vannamei*, onde (a) movimento peristáltico do
449 intestino na fase larval de Misis (b) Proporção adequada músculo: intestino de pós-
450 larva.



451

Foto: Sabrina Suita

452 Figura 8- Fouling epibionte parasitando a carapaça de pós-larva de *Litopenaeus*
453 *vannamei*, uma bactéria filamentosa é indicada pela seta.



454

Foto: Sabrina Suita

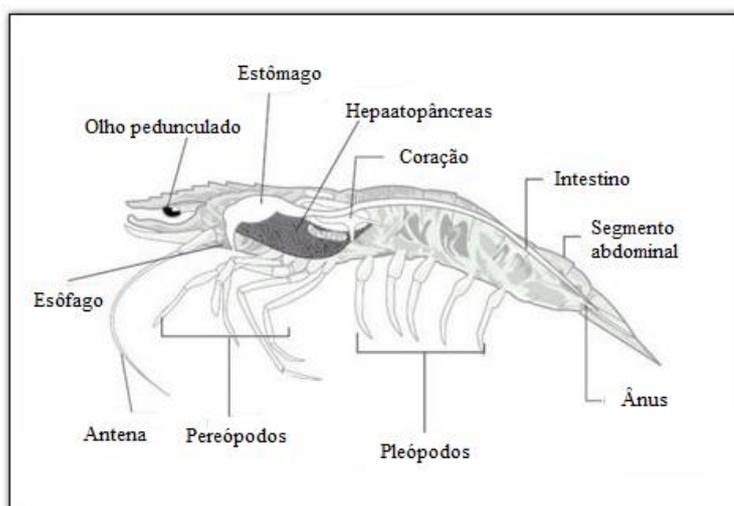
455 Figura 9- Arcos e lóbulos brânquias de pós-larva.

456 De uma maneira geral as avaliações de qualidade fornecem mecanismos
457 fundamentais para a seleção de pós-larvas mais resistentes ao período de engorda,
458 porém tais critérios ainda são considerados subjetivos e, por isto, não devem ser
459 considerados isoladamente no momento de se aceitar ou descartar um lote (Tayamen &
460 Brown 1999, Suita *et al.* 2015a).

461 **O HEPATOPÂNCREAS**

462 O hepatopâncreas é o maior órgão dos crustáceos decápodes, ocupando uma
463 grande porção do cefalotórax (Srelnam & Menon 2005) sendo responsável por secretar
464 e sintetizar enzimas, absorver material digerido, reservar minerais e produtos orgânicos,
465 metabolizar lipídeos e carboidratos além de distribuir e estocar reservas para o período

466 de muda (Felgenhauer 1992). Na Figura 10 é possível observar a localização de
467 diferentes órgãos e do hepatopâncreas em um camarão peneídeo.



468

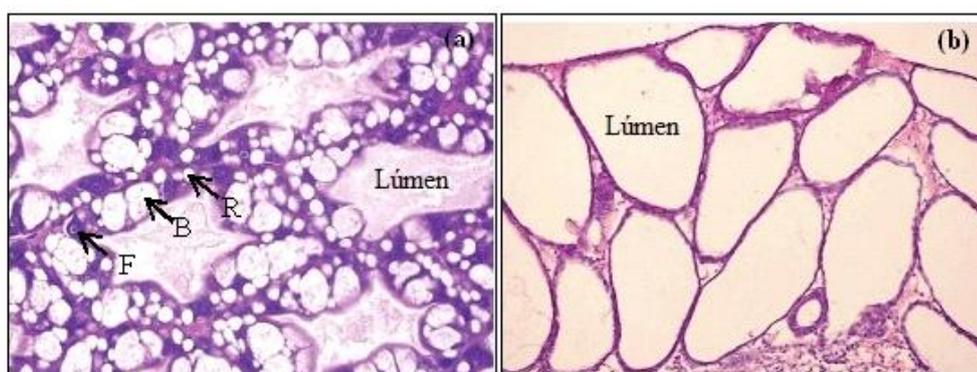
469 Figura 10- Esquema anatômico dos órgãos de um camarão peneídeo (FAO & NACA
470 2001).

471 O estômago dos crustáceos decápodos é dividido em duas porções, uma pilórica
472 e outra cardíaca, durante a digestão os agentes emulsificantes e as enzimas sintetizados
473 e excretados pelo hepatopâncreas passam por estas cavidades e através das cerdas
474 filtrantes ocorre digestão intra e extracelular (Ceccaldi 1989).

475 O hepatopâncreas é composto por túbulos os quais em suas paredes podem ser
476 diferenciados quatro tipos celulares epiteliais, as células E, F, R e B. A caracterização
477 destes túbulos e a presença de suas células podem ser utilizados como indicadores de
478 boa qualidade de pós-larvas de camarões peneídeos (FAO 2004). As células E também
479 são chamadas de embrionárias, são pouco abundantes e durante o processo digestivo
480 não são observadas nas paredes dos túbulos, estas células sofrem uma diferenciação
481 citoplasmática derivando as células F e R, as quais maturam e originam uma célula
482 secretora, denominada célula B. As células F são basófilas com citoplasma fibrilar e as
483 células R são as mais abundantes, possuem núcleo basal e três nucléolos, estas estocam

484 lipídeos e glicogênio. As células B estão envolvidas com a digestão propriamente dita,
485 estas são as maiores células, possuindo um grande vacúolo envolto por uma fina
486 camada de citoplasma, com núcleo restrito a região basal (Ceccaldi 1989, Cuartas *et al.*
487 2002). As células B quando ocorrem em grande quantidade são indicativas de atividade
488 digestiva (Marcolin *et al.* 2008), após assimilação de nutrientes extravasam o material
489 para o interior do lúmen (Al-Mohanna & Nott 1989).

490 A histologia é uma ferramenta utilizada para avaliar as modificações teciduais
491 decorrentes das demandas fisiológicas, ajudando a identificar as modificações
492 morfofuncionais do hepatopâncreas e, desta forma, tal técnica pode ser usada para
493 identificação da presença de patógenos (FAO 2013), ciclo de muda (Al-Mohanna &
494 Nott, 1989) e mais recentemente a estrutura dos túbulos do hepatopâncreas e a presença
495 de suas células podem ser utilizadas para avaliação da condição nutricional em
496 camarões adultos e pós-larvas de peneídeos, pois um hepatopâncreas em boa condição
497 nutricional apresenta paredes mais espessas, permitindo a visualização de células
498 digestivas, principalmente as células B (FAO 2013, Suita *et al.* 2015a) (Figuras 11a e
499 11b).



500
501 Figura 11- Fotografia da histoquímica de túbulos do hepatopâncreas corados com H&E
502 (40x magnificação), onde (a) hepatopâncreas normal de *Litopenaeus vannamei* com a
503 presença de células R, F e B; (b) hepatopâncreas lesado de *Penaeus monodon* com
504 paredes finas e ausência de células (FAO 2013).

505 **ALIMENTAÇÃO NAS FASES INICIAIS DE VIDA**

506 O desenvolvimento do trato digestório e as modificações, as quais larvas de
507 camarões peneídeos passam desde o momento da eclosão, demandam modificações na
508 composição da dieta (Le Vay 1993). Uma dieta é considerada adequada quando seus
509 teores de lipídeos, carboidratos e proteínas estão balanceados e de acordo com a
510 necessidade da espécie que irá consumi-la (Barros & Valente 2003).

511 A ração é um item indispensável em laboratórios de larvicultura, onde larvas e
512 pós-larvas consomem uma combinação de alimentos vivos, como microalgas e *Artemia*,
513 além de diferentes composições de rações, com teores de proteína bruta em torno de
514 50% (FAO 2004). Embora o fornecimento de alimentos vivos e de ração inerte seja uma
515 técnica eficaz para o bom desempenho desta espécie, existe uma série de vantagens e
516 desvantagens ambientais e econômicas envolvidas em ambas as fontes de alimentos.

517 Em geral, presas vivas suprem todas as necessidades de nutrientes além do que
518 oferecem a possibilidade de bioenriquecimento (Le Vay 1993), por outro lado, são de
519 alto custo e possíveis vetores de doenças (Southgate & Partridge 1998, Naylor *et al.*
520 2009).

521 A alimentação inadequada durante as primeiras fases de vida pode trazer uma
522 série de problemas que serão refletidos ao longo da produção, por exemplo, uma
523 quantidade reduzida pode retardar o crescimento, reduzir sobrevivência, aumentar stress
524 e canibalismo. Da mesma forma, o alimento em excesso pode causar deformidades,
525 dificuldade de muda e aumento de “*fouling*” epibionte sobre carapaça e brânquias (FAO
526 2004).

527 O alimento não consumido e a excreção dos animais resultam em acúmulo de
528 amônia na água, e segundo Cobo *et al.* (2012), concentrações deste composto acima de
529 1,32 mg/L podem ser tóxicas para pós-larvas de *L. vannamei*. As microalgas podem

530 atuar no controle da qualidade da água, uma vez que absorvem o nitrogênio amoniacal
531 para formar nova biomassa (Thompson *et al.* 2002). Além disto, são essenciais como
532 primeira alimentação na fase de zoea e seguem sendo utilizadas ao longo da larvicultura
533 e pré-berçário, sendo as microalgas unicelulares tais como *Thalassiosira*, *Tetraselmis*,
534 *Isochrysis* e *Chaetoceros*, os gêneros mais utilizados neste período (FAO 2004).

535 As microalgas apresentam alta digestibilidade, pois possuem baixo conteúdo de
536 fibras e a digestibilidade do gênero *Chaetoceros* (Figura 12) pode chegar ate 94%
537 (Jaime & Ceballos *et al.* 2006). Além disto, são fontes proteicas (Silva *et al.* 2008) e de
538 carboidrato que são utilizados como reserva energética para larvas de camarões (Lavens
539 & Sorgeloos 2000). Godoy *et al.* (2012) relatam que juvenis de *L. vannamei* cultivados
540 em sistema sem renovação de água e suplementação de microalgas obtiveram maior
541 ganho de peso e menor consumo de ração do que aqueles cultivados em meio à
542 bioflocos ou a mistura de ambos. Tais resultados evidenciaram a importância das
543 microalgas para a fase de berçário desta espécie, uma vez que contribuem
544 substancialmente como fonte de carbono para a dieta de pós-larvas (Dittel *et al.* 1997).

545 A densidade das microalgas deve ser mantida em condições adequadas para isto,
546 contagens celulares devem ser feitas diariamente e a reposição feita sempre que
547 necessário, já que as constantes renovações de água no período de larvicultura resultam
548 em perdas de biomassa fitoplantônica (FAO 2004). Mesmo nos sistemas de bioflocos,
549 onde há mínima renovação de água, as altas concentrações de material em suspensão
550 reduzem a penetração de luz e causam um colapso na fotossíntese, reduzindo o
551 crescimento das microalgas (Godoy *et al.* 2012). A produção de microalgas pode ser
552 mais econômica do que alimentos inertes e de mais praticidade no momento da
553 aplicação (Barbieri Jr. & Ostrensky Neto 2001). Neste contexto, Godoy *et al.* (2012)

554 recomendam que pesquisas devem ser conduzidas com o intuito de manter microalgas
555 no meio de cultivo por mais tempo.

556 *Artemia* é um microcrustáceo filtrador, não seletivo que eclode a partir de cistos,
557 na forma de náuplios, tolerantes a amplas variações ambientais (Figura 13), estes cistos
558 são fornecidos comercialmente à indústria aquícola de forma desidratada (Hoff & Snell
559 2008), os quais podem apresentar grande variabilidade na qualidade nutricional,
560 tamanho, taxa de eclosão e valor comercial, de acordo com a origem dos cistos e
561 empresa fornecedora (Lavens & Sorgeloos 2000). Ainda que diferentes origens
562 interfiram na qualidade nutricional, existem empresas no mercado mundial as quais
563 garantem qualidade dos cistos e aliam tecnologia à sua produção e manejo (Sorgeloos *et*
564 *al.* 2001).

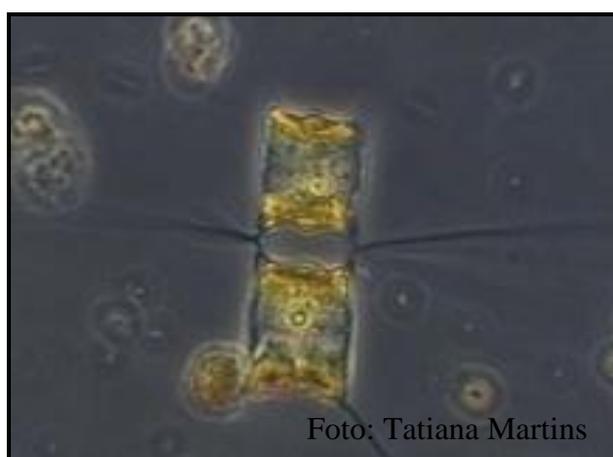
565 A importância do fornecimento de *Artemia* se dá pelo fato deste organismo
566 possuir alta digestibilidade, conter aproximadamente 50% de proteína em sua
567 composição corporal (Treece 2000), além de vários nutrientes essenciais o que torna sua
568 utilização vantajosa para alimentação na aquicultura (Léger *et al.* 1986), sendo
569 considerado, atualmente, um alimento indispensável para as fases iniciais de vida de
570 camarões marinhos (FAO 2004).

571 Embora seu consumo traga benefícios nutricionais, a redução do fornecimento
572 de *Artemia* significa um benefício econômico (Gamboa & Le Vay 2009) e ambiental,
573 uma vez que mudanças climáticas se encaminham para diminuição da salinidade nos
574 ecossistemas aquáticos mundiais, diminuindo os estoques de *Artemia*. Desta forma são
575 necessários esforços para que haja uma diminuição da dependência por esta fonte
576 encorajando pesquisas que visem a substituição por fontes mais viáveis
577 economicamente e ambientalmente (Sorgeloos *et al.* 2001).

578 Já as dietas artificiais são produzidas seguindo as exigências específicas de cada
579 espécie para cada fase de vida, sendo desta forma mais eficiente energeticamente (Brito
580 *et al.* 2004). Dietas artificiais podem conter algas secas ou líquidas, “*pellets*”
581 microencapsulados, que podem ser enriquecidos ou não, em geral são produzidas em
582 tamanho compatível com a boca da larva, a qual modifica de acordo com sua ontogenia,
583 facilitando o manejo. Porém, devem ser armazenadas cuidadosamente e balanceadas de
584 acordo com a necessidade e hábitos da espécie, além do que são recomendados apenas
585 como fonte complementar aos alimentos vivos (FAO 2004). Uma dieta baseada em
586 sistema de co-alimentação entre ração artificial e alimento vivo parece ser a maneira
587 mais eficaz de se obter bons resultados econômicos e ambientais (D’Abramo *et al.*
588 2006).

589 Conhecer qual fonte de alimento é mais eficaz para um bom desempenho de
590 pós-larvas jovens de *L. vannamei* é uma forma de otimizar a produção e merece ser
591 estudada mais criteriosamente (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009).

592 Na Tabela I são apresentadas a composição proximal dos diferentes itens
593 alimentares utilizados nas fases iniciais de vida de *L. vannamei*.



594

595 Figura 12- Microalga *Chaetoceros muelleri* (Objetiva 40x).



Foto: Sabrina Suita

596

597 Figura 13- Náuplio de *Artemia* sp. (Objetiva 10x).

598 Tabela I. Composição proximal das diferentes fontes de alimento ofertadas nas
599 fases iniciais de visa de *L. vannamei*.

Fontes de alimento	PB	Lipídeos	Carboidratos	Referências
<i>C. muelleri</i>	34-38,5	9,29	19,4	Chen (1991); Moss (1994)
<i>T. weissflogii</i>	34	12,69	16,6	Derner et al. (2006)
<i>Artemia</i> sp.	42-60	10,29	15	Chen (1991); Treece (2000)
Bioflocos	31	0,49	23,59	Wasielesky et al. (2006)
Stresspak -INVE®	42	6	N.I*	Dados Fabricante
Flake -INVE®	50	9	N.I*	Dados Fabricante
PL40-GUABI™	40	7,5	N.I*	Dados Fabricante
40 J-GUABI™	40	7,5	N.I*	Dados Fabricante

600

601 *N.I. Dados não informados

602 A REDUÇÃO DAS TAXAS DE RENOVAÇÃO DE ÁGUA

603 Sistemas de engorda de camarões em cultivos com limitadas trocas de água já
604 estão estabelecidos e estudos que visam otimizar este tipo de prática são encontrados na
605 literatura atual (Wasielesky *et al.* 2006, Gaona *et al.* 2011, Furtado *et al.* 2011, 2014,
606 Emerenciano *et al.* 2013, Silva *et al.* 2013, Krummenauer *et al.* 2014, Suita *et al.*
607 2015b). Estes sistemas são denominados como sistemas de bioflocos, e são
608 caracterizados pela transformação do nitrogênio inorgânico, que é tóxico aos animais
609 produzidos, em biomassa microbiana mediante a adição de uma fonte de carbono
610 orgânico ao meio (Avnimelech 1999). Além de melhorar a qualidade da água,
611 reduzindo a necessidade de renovações constantes, a formação de uma biota natural,
612 composta predominantemente por organismos heterotróficos, pode ser aproveitada

613 como alimento para os organismos produzidos. De acordo com Burford *et al.* (2004a), a
614 biota natural, quando consumida por adultos de *L. vannamei*, pode contribuir em até
615 29% para seu crescimento.

616 Porém, em sistemas convencionais de larvicultura e berçário de camarões
617 marinhos, esta prática ainda é pouco aplicada e as renovações de água são constantes,
618 podendo alcançar 100% do volume do tanque ao dia, desde a fase de misis (FAO 2004).

619 Alguns trabalhos visam o desenvolvimento de berçários de camarões em
620 sistemas com mínima renovação de água, porém a maior parte refere-se a pós-larvas
621 após a fase de PL₁₅ (Burford *et al.* 2004b, Lopes *et al.* 2012, Souza *et al.* 2012,
622 Emerenciano *et al.* 2013, Hostins *et al.* 2015, Serra *et al.* 2015). Em poucos trabalhos
623 são encontrados dados sobre a suspensão das trocas de água desde a fase de PL₁
624 (Beserra da Silva *et al.* 2012, Suita *et al.* 2015a), desta forma pouco se sabe sobre a
625 influência deste tipo de sistema sobre camarões nas fases iniciais de vida. Contudo
626 sabe-se que os microrganismos são capazes de fornecer nutrientes importantes, capazes
627 de suplementar a alimentação de camarões peneídeos desde suas fases mais jovens
628 (Ballester *et al.* 2010, Emerenciano *et al.* 2012).

629 Grande parte das informações encontradas sobre consumo de microrganismos
630 por pós-larvas de camarões, vem de estudos relacionados com interações com biofilme.
631 Este é um consórcio de microrganismos colonizando uma matriz submersa (Figura 14),
632 os quais podem contribuir para o ganho de peso de camarões (Thompson *et al.* 2002,
633 Moss & Moss 2004, Ballester *et al.* 2003, 2007, Abreu *et al.* 2007) e hábeis na
634 formação de um sistema eficiente de melhoria da qualidade da água, auxiliando nos
635 processos de nitrificação (Bratvold e Browdy 2001, Moss & Moss 2004).

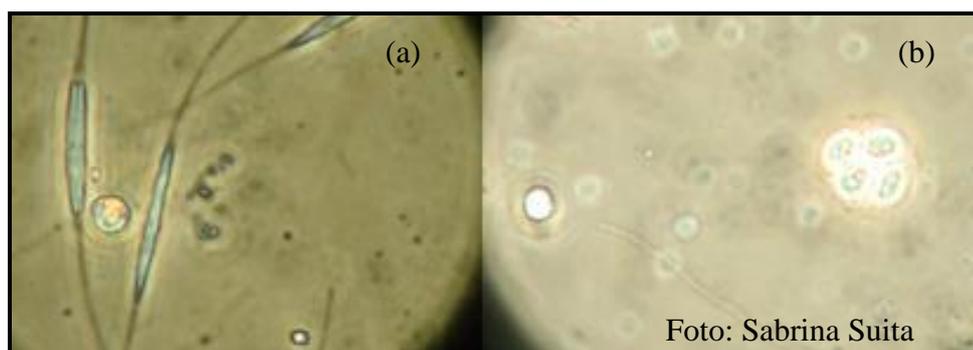
636 Exceto pela colonização bacteriana, a constituição do biofilme e dos bioflocos,
637 geralmente, apresenta-se de maneira similar quanto aos seus grupos. Estudos com

638 caracterização microbiológica de bioflocos em cultivo de camarões marinhos observam
639 a presença de diferentes grupos de microalgas (Figuras 15a e 15b), ciliados (Figura 16a)
640 e nematoides (Figura 16b), (Burford *et al.* 2004a, Emerenciano *et al.* 2013, Suita *et al.*
641 2015b) o mesmo pode ser observado no biofilme (Abreu *et al.* 2007, Thompson *et al.*
642 2002, Ballester *et al.* 2003, 2007). Estes microrganismos são excelentes fontes de
643 nutrientes e contribuem para o bom desempenho dos organismos consumidores
644 (Zhukova & Kharlamenko 1999).



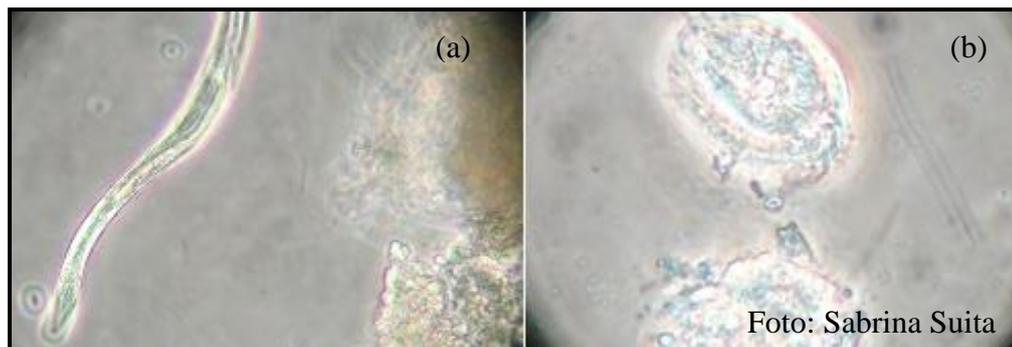
645

646 Figura 14- Superfície de unidade experimental colonizada por biofilme durante
647 experimentos apresentados no capítulo IV da presente tese.



648

649 Figura 15- Microalgas encontradas em sistema de bioflocos onde (a) Microalgas
650 penadas e (b) *Oocystes* sp. (Objetiva 20x).



651

652 Figura 16- Microbiota encontrada em sistema de bioflocos onde (a) Nematóide e (b)
653 Ciliado $\geq 20\mu\text{m}$ (Objetiva 20x).

654 A confirmação de predação de camarões peneídeos sobre a microbiota já foi
655 realizada por técnicas de análise de conteúdo estomacal (Thompson *et al.* 2002, Soares
656 *et al.* 2005) e, mais recentemente, a técnica de isótopos estáveis corrobora com tais
657 resultados evidenciando a predação de peneídeos de diferentes fases de vida sobre a
658 microbiota natural (Burford *et al.* 2004a, Abreu *et al.* 2007). Contudo, a influência da
659 suspensão das renovações de água ainda que se saiba sua eficácia para uma boa
660 qualidade da água, até o presente momento é pouco conhecida para indivíduos desde a
661 fase de PL₁, principalmente no que se refere à contribuição destes microrganismos para
662 o crescimento dos camarões.

663 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

664 A disposição dos organismos nos ecossistemas é determinada pela transferência
665 de energia de um alimento até um consumidor, indicando qual a posição ou nível trófico
666 cada indivíduo ocupa na cadeia trófica. Logo, organismos que consomem um recurso
667 alimentar semelhante, ocupam posições semelhantes na cadeia trófica (Link 2002). Um
668 dos métodos tradicionais para se avaliar interações alimentares na cadeia trófica é por
669 análise do conteúdo estomacal.

670 Todavia, os resultados obtidos por esta técnica são pouco precisos, uma vez que
671 nos permitem identificar apenas o que foi consumido momentos antes da coleta e não
672 necessariamente o que é incorporado aos tecidos e utilizado para o crescimento. Há,
673 também, outro entrave no que se refere à identificação de presas após sofrer trituração
674 durante a passagem pelo trato digestório (Schwamborn & Criales 2000, Coman *et al.*
675 2006). Em indivíduos pequenos este tipo de análise também é bastante prejudicada não
676 apenas pelo tamanho dos animais, mas pelo reduzido tamanho de suas presas (Gamboa-
677 Delgado & Le Vay 2009), assim uma alternativa metodológica quem vem sendo
678 empregada nas últimas décadas para o estudo de teias alimentares é uso da técnica de
679 isótopos estáveis.

680 O princípio desta técnica fundamenta-se na constatação de que os isótopos
681 estáveis de diferentes elementos químicos refletem a proporção do alimento no
682 momento da síntese dos tecidos dos animais, logo seu uso pode servir como um traçador
683 nutricional, possibilitando determinar a influência de uma dieta no crescimento de um
684 consumidor em um dado período de tempo, uma vez que o valor isotópico de um
685 consumidor tende a ser semelhante ao valor da dieta assimilada (Peterson & Fry 1987).

686 Na última década, em pesquisas com produção aquícola, esta técnica vem sendo
687 bastante utilizada, uma vez que auxilia no entendimento de qual fonte alimentar se
688 sobrepõe em importância para a espécie cultivada, objetivando otimizar a produção,
689 reduzindo custos com alimentação e melhorando o desempenho dos animais produzidos.

690 Estudos prévios, com aplicação desta técnica, apresentam resultados quanto a
691 incorporação de alimento vivo versus inerte no tecido de larvas de *Solea senegalensis*
692 (Gamboa-Delgado *et al.* 2008) ou de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Gamboa-
693 Delgado & Le Vay 2009), a influência do biofilme no consumo alimentar de juvenis de
694 *Farfantepenaeus paulensis* (Abreu *et al.* 2007), contribuição da biota natural para pós-

695 larvas de *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.* 2004b), a contribuição da biota natural
696 para adultos de *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.* 2004a) e incorporação de
697 nitrogênio de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* oriundo de farinha de peixe ou
698 vegetal (Martinez-Rocha *et al.* 2013).

699 Para que a determinação dos valores isotópicos em tecidos seja conhecida é
700 necessária a utilização de um espectrômetro de massa ou “*Isotope Ratio Mass*
701 *Spectrometers*”, contudo, a reduzida disponibilidade de laboratórios que possuam este
702 equipamento e que dominem o uso desta técnica ainda é limitada no mundo e os altos
703 custos para tal uso ainda impedem o avanço mais acelerado dessa área (Lima-Franco *et*
704 *al.* 2014).

705 Além disto, para que os resultados sejam confiáveis é necessário que seja
706 conhecido um fator denominado como “fator de discriminação” ou “fracionamento
707 isotópico”, que é a diferença entre a composição isotópica de uma fonte de alimento e
708 um consumidor (Fry 2006). O ajuste dos dados ao fracionamento correto para cada caso
709 é indispensável para correção dos dados isotópicos, no entanto, isto ainda é um entrave
710 para a expansão de aplicabilidade desta técnica, pois estes fatores são dependentes de
711 muitos parâmetros, tais como o status nutricional do consumidor, qualidade e tipo da
712 dieta, tamanho e ontogenia da espécie estudada e o tipo de tecido analisado (Caut *et al.*
713 2009).

714 De acordo com Peterson & Fry (1987), de uma maneira geral, o fracionamento
715 entre os animais e sua dieta varia na média de 3-5 partes em relação ao nitrogênio e de
716 0-1 em relação ao carbono. Porém, para uma maior confiabilidade dos resultados ainda
717 são necessários estudos mais específicos relacionando diferentes fontes de alimento e
718 consumidores, com seus respectivos fracionamentos uma vez que, até o momento, a

719 maior parte dos estudos utilizam de dados encontrados na bibliografia para espécies ou
720 fontes de alimento semelhantes (Gamboa-Delgado *et al.* 2013).

721 Além disto, Philips *et al.* (2014) consideram que algumas questões devem ser
722 consideradas antes de se iniciar trabalhos com análise de isótopos estáveis, dentre elas
723 considerar todas as informações a respeito da dieta da espécie estudada, uma vez que os
724 modelos matemáticos utilizados para avaliação dos dados são sensíveis às variações das
725 fontes alimentares. Assim é possível que sejam obtidas estimativas errôneas quando
726 alguma fonte não é incluída ao modelo, embora

727 Os chamados modelos de mistura são modelos matemáticos estatísticos que
728 convertem os valores isotópicos das fontes alimentares e dos tecidos estudados em
729 estimativas de contribuição para crescimento do animal (Philips 2012). O modelo de
730 mistura bayesiano para isótopos estáveis, SIAR (*Stable isotopes Analysis in R*) é um
731 modelo mais atual de análise e é considerado mais rigoroso do que outros modelos
732 aplicados para análises de isótopos estáveis, trazendo vantagens em relação aos outros
733 modelos de mistura uma vez que este incorpora o fator de discriminação isotópica ao
734 modelo, resultando em intervalos com probabilidades de contribuição de cada fonte
735 (Parnell *et al.* 2010).

736 É dito que uma espécie assume um perfil isotópico semelhante a sua dieta após
737 incorporá-la aos seus tecidos denotando um estado de equilíbrio isotópico, este tempo é
738 espécie-específico e relacionado com a ontogenia e taxa metabólica da espécie em
739 questão (Pearson *et al.* 2003). Estudos prévios com camarões jovens estimaram que
740 quinze dias é o tempo necessário para que haja este equilíbrio entre o organismo e a
741 dieta (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009, Gamboa-Delgado *et al.* 2013) ou no momento
742 em que o organismo quadruplica o seu peso (Fry & Arnold 1987).

743 Este tempo é relacionado com a reposição tecidual e taxa metabólica e é
744 denominada de “*Turnover*”, determinando o quão rapidamente a assinatura isotópica de
745 uma dieta é incorporada ao tecido do animal. Através do conhecimento do “*Turnover*”,
746 pode-se entender qual o período necessário no qual cada espécie assimila os nutrientes
747 da nova dieta nos tecidos e, assim inferir a identidade da presa e hábito alimentar do
748 animal (Pearson *et al.* 2003). Martinez-Rocha *et al.* (2013) em estudo com pós-larvas de
749 *L. vannamei* citam que é necessário um tempo de quinze a vinte dias para entrarem em
750 equilíbrio com todas as dietas ofertadas, isto porque um indivíduo que cresce
751 rapidamente terá uma rápida taxa de “*Turnover*”, comparado com os organismos que
752 têm crescimento relativamente mais lento.

753 Apesar de todas as questões que envolvem um conhecimento aprofundado sobre
754 a espécie em questão e da aplicabilidade desta técnica, o uso dos isótopos estáveis é
755 considerado uma importante ferramenta para entender o fluxo energético em
756 ecossistemas e vem sendo utilizado com sucesso em vários trabalhos com enfoque na
757 aquicultura (Burford *et al.* 2004a, 2004b, Coman *et al.* 2006, Abreu *et al.* 2007,
758 Gamboa-Delgado *et al.* 2008, 2013, Gamboa-Delgado & Le Vay 2009, Holl *et al.* 2011,
759 Martinez-Rocha *et al.* 2013).

760 Desta forma, o uso desta técnica apresenta-se como uma opção eficaz para, em
761 conjunto com outros critérios de avaliação, esclarecer as demandas fisiológicas
762 dependentes do tipo de alimento ofertado, questão de extrema importância para o
763 avanço dos estudos em aquicultura.

764 **JUSTIFICATIVA**

765 Este trabalho justifica-se devido à necessidade do desenvolvimento de
766 tecnologias que garantam maior biossegurança, racionalização do uso da água, sem

767 prejuízos para a qualidade de produção desde as fases iniciais de vida de *Litopenaeus*
768 *vannamei*.

769 **OBJETIVO**

770 A presente tese tem como objetivo geral avaliar a produção de pós-larvas de
771 *Litopenaeus vannamei* em sistemas de bioflocos, determinar como diferentes fontes
772 alimentares contribuem no crescimento e qualidade das pós-larvas em sistemas de
773 bioflocos comparado ao sistema tradicional em água clara com renovação de água.

774 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 775 ✓ Avaliar os efeitos da suspensão da renovação de água na qualidade da
776 água de cultivo de pós-larvas de *L. vannamei* (Capítulos I, II, III e IV);
- 777 ✓ Avaliar os efeitos da suspensão de renovação de água na qualidade das
778 pós-larvas de *L. vannamei* (Capítulos I e II);
- 779 ✓ Caracterizar a microbiota constituinte dos bioflocos neste estágio de vida
780 de *L. vannamei* (Capítulos II e III);
- 781 ✓ Verificar se os bioflocos são consumidos por pós-larvas dessa espécie
782 (Capítulos II e III);
- 783 ✓ Determinar o efeito que a produção em sistemas de bioflocos tem sobre o
784 hepatopâncreas de pós-larvas de *L. vannamei*, comparado a pós-larvas
785 cultivadas em água clara (Capítulos II, III e IV);
- 786 ✓ Verificar qual fonte alimentar contribui mais efetivamente para o
787 crescimento de pós-larvas de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos e
788 água clara (Capítulos II, III e IV).

789

790

791

792 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 793 ABCC, Associação Brasileira de criadores de camarão. 2005 Programa de biosegurança
794 para Fazendas de Camarão Marinho Recife^{1th} (ed), 68p.
- 795 ABREU, PC, ELC BALLESTER, C ODEBRECHT, W WASIELESKY, RO
796 CAVALLI, G WILHELM & A ANESIO. 2007. Importance of biofilm as food
797 source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$
798 and $\delta^{15}\text{N}$) *Jour. of Exper. Mar. Biol. and Ecol.*, 347: 88-96.
- 799 AL-MOHANNA, SY & JA NOTT. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of
800 *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine*
801 *Biology*, 101: 535-544.
- 802 ARNOLD, SJ, MJ SELLARS, PJ CROCOS & GJ COMAN. 2006. An evaluation of
803 stocking density on the intensive production of juvenile brown tiger shrimp
804 (*Penaeus esculentus*). *Aquaculture*, 256:174-179.
- 805 AVNIMELECH, Y. 1999. C/N ratio as a control element in aquaculture systems.
806 *Aquaculture*, 176: 227-235.
- 807 BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI, MHS SANTOS, PC ABREU.
808 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus*
809 *paulensis* em sistemas de berçário. *Atlântica*, 1:1-10.
- 810 BALLESTER, ELC , W WASIELESKY, RO CAVALLI, PC ABREU. 2007. Nursery
811 of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates:
812 Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269:355-362.
- 813 BALLESTER, ELC, PC ABREU, RO CAVALLI, M EMERENCIANO, L de ABREU
814 &W WASIELESKY. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on
815 the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange
816 suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16:163-172.

817 BARBIERI Jr., RC & A OSTRENSKY NETO. 2001. Camarões Marinhos: reprodução,
818 Maturação e Larvicultura. Viçosa: Aprenda Fácil ed. 255p.

819 BARROS, HP & WC VALENTI. 2003. Ingestion rates of *Artemia* nauplii of different
820 larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 217:223-233.

821 BESERRA DA SILVA, EF, CN FROÉS, DM SOUZA, R SOARES, S PEIXOTO, W
822 WASIELESKY & ELC BALLESTER. 2012. O uso de probióticos na produção de
823 pós-larvas do camarão-rosa. *Pesq. Agropec. Bras.*, 47:869-874.

824 BRATVOLD, D & CL BROWDY. 2001. Effects of sand sediment and vertical
825 surfaces (AqaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an
826 intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195:81-94.

827 BRITO, R, ME CHIMAL, G GAXIOLA, C ROSAS. 2000. Growth, metabolic rate, and
828 digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae
829 fed different diets. *Jour. of Exper. Mar. Biol. and Ecol.*, 255:21-36.

830 BRITO, R, ME CHIMAL, G GAXIOLA, R GELABERT & C ROSAS. 2004. Effect of
831 artificial and natural diets on energy allocation in *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus,
832 1767) and *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquaculture*,
833 237:517-531.

834 BOYD, CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level.
835 *Aquaculture*, 226: 101-112.

836 BURFORD, MA, PJ THOMPSON, RC MCINTOSH, RH BAUMAN & DC
837 PEARSON. 2004a. The contribution of flocculated material to shrimp
838 (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity zero-exchange system.
839 *Aquaculture*, 232:525-537.

840 BURFORD, MA, MJ SELLARS, SJ ARNOLD, SJ KEYS, PJ CROCOS & NP
841 PRESTON. 2004b. Contribution of the natural biota associated with substrates to

842 the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus*
843 (Haswell), in high-density rearing systems. *Aquaculture Research*, 35:508-515.

844 CAUT, S, E ANGULO & F COURCHAMP. 2009. Variation in discrimination factors
845 $\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$: The effect of diet isotopic values and applications for diet
846 reconstruction. *Jour. of Appl. Ecol.*, 46:443-453.

847 CECCALDI, HJ. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans
848 Decapods reared in Aquaculture. Advances in Tropical Aquaculture. AQUACOP,
849 IFREMER, Actes de Colloque 9, pp. 243-259.

850 COBO, M de L, S SONNENHOLZNER, M WILLE & P SORGELOOS. 2012.
851 Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture*
852 *Research*, 1-6.

853 COMAN, FE, RM CONNOLLY, SE BUNN & NP PRESTON. 2006. Food sources of
854 the sergestid crustacean, *Acetes sibogae*, in shrimp ponds. *Aquaculture*, 259:222-
855 233.

856 CUARTAS, EI, AC DIAZ & AN PETRIELLA. 2002. Estudio morfológico e histológico
857 del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (BATE) (CRUSTACEA,
858 PENAEOIDEA). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.*, 15:5-13.

859 D'ABRAMO, LR, EI PEREZ, R SANGHA & A PUELLO-CRUZ. 2006. Successfull
860 culture of larvae of *Litopenaeus vannamei* fed a microbound formulated diet
861 exclusively from either stage PZ2 or M1 to PL1. *Aquaculture*, 261:1356-1362.

862 DITTEL, AL, CE EPIFANIO, LA CIFUENTES & DL KIRCHMAN. 1997. Carbon e
863 Nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove
864 system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 45: 629-637.

865 EMERENCIANO, M, ELC BALLESTER, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2011.
866 Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp

867 *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity
868 stress tolerance. *Aquac. Int.*, 19:891-901.

869 EMERENCIANO, M, ELC BALLESTER, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2012.
870 Biofloc Technology application as a food source in a limited water exchange
871 nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817).
872 *Aquac. Res.*, 43:447-457.

873 EMERENCIANO, M, G CUZON, A PAREDES & G GAXIOLA. 2013. Evaluation of
874 biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus dourarum* culture: Growth,
875 performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of
876 biofloc. *Aquac. Int.*, 21:1381-1394.

877 FAO & NACA. 2001. Food and Agriculture of the United Nations and Network of
878 Aquaculture Centers in Asia-Pacific. Organization of Asia Diagnostic Guide to
879 Aquatic Animal Diseases. Fisheries Technical Paper, 402/2:191p.

880 FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de
881 postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en America Latina. Roma:
882 Documento Tecnico de Pesca, 450p.

883 FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma SOFIA, pp.24-26

884 FAO. 2013. Technical workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute
885 Hepatopancreatic Necrosos Syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under
886 TCP/VIE/3304). Report No. 1053. Hanoi, Viet Nam, 25-27 June.

887 FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma 2014 SOFIA 223p.

888 FELGENHAUER, B. 1992. Internal anatomy of the decapoda: On overview. In:
889 Microscopic Anatomy of Invertebrates, 10:45-75.

890 FRY, B & C ARNOLD. 1987. Rapid ¹³C/¹²C turnover during growth of the brown
891 shrimp (*Penaeus azectus*). *Oecologia*, 54:200-204.

892 FURTADO, PS, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2011. Effect of calcium
893 hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical
894 performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT)
895 systems. *Aquaculture*, 321:130–135.

896 FURTADO, PS, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2014. The effect of different
897 alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with a biofloc technology (BFT).
898 *Aquac. Int.*, 23(1): 345-358.

899 GAMBOA-DELGADO, J, JP CAÑAVATE, R ZEROLO & L LE VAY. 2008. Natural
900 carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and
901 inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Soela senegalensis*). *Aquaculture*,
902 280:190-197.

903 GAMBOA-DELGADO, J & L LE VAY. 2009. Artemia replacement in co-feeding
904 regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional
905 contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon by stable
906 isotopes. *Aquaculture*, 297:128-135.

907 GAMBOA-DELGADO, J, MG ROJAS-CASAS, MG NIETO-LOPEZ & LE CRUZ-
908 SOAREZ. 2013. Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish
909 meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp
910 (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture*, 380-
911 383:33-40.

912 GAONA, CAP, L POERSCH, D KRUMMENAUER, GK FOES & W WASIELESKY.
913 2011. The effects of solids removal on water quality, growth and survival of
914 *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Intern. Jour. of*
915 *Recirc. Aquac.*, 12:54-73.

916 GODOY, LC, C ODEBRECHT, ELC BALLESTER, TG MARTINS & W
917 WASIELESKY. 2012. Effect of diatom supplementation during the nursery rearing
918 of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. *Aquac.*
919 *Int.*, 20: 559-569.

920 HOFF, FH & TW SNELL. 2008. Plankton Culture Manual. 6 th edition. 186p.

921 HOLL, CM, CT GLAZER & SM MOSS. 2011. Nitrogen stable isotopes in recirculating
922 aquaculture for super-intensive shrimp production: Tracing the effects of wáter
923 filtration on microbial nitrogen cycling. *Aquaculture*, 311:146-154.

924 HOSTINS, B, A BRAGA, DLA LOPES, W WASIELESKY & LH POERSCH. 2015.
925 Effect of temperature on nursery and compensatory growth of pink shrimp
926 *Farfantepenaeus brasiliensis* reared in a super-intensive biofloc system. *Aquac.*
927 *Engin.*, 66:62-67.

928 JAIME-CEBALLOS, BJ, A HERNANDEZ-LAMAS, T GARCIA-GALANO & H
929 VILLARREAO. 2006. Susbtitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis*
930 meal in diets for *Litopenaeus schmitii* larvae. *Aquaculture*, 260:215-220.

931 JIMENÉZ-YAN, L, BRITO A, CUZON G, GAXIOLA G, GARCIA T, TABOADA G,
932 SOTO LA & BRITO R. 2006. Energy balance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae
933 fed on animal or vegetable protein based compounded feeds. *Aquaculture*, 260:337-
934 345.

935 KITANI, H. 1986. Larval development of the White shrimp *Penaeus vannamei*
936 BOONE Reared in the Laboratory and the Statistical Observation of its Naupliar
937 Stages. *Bul.of the Japon. Soc. of Scient. Fish.*, 52(7):1131-1139.

938 KRUMMENAUER, D, T SAMOCHA, LH POERSCH, G LARA & W WASIELESKY.
939 2014. The reuse of water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus*
940 *vannamei*, in BFT System. *Jour. of World Aquac. Soc.*, 45(1):3-14.

- 941 LAVENS, P & P SORGELOOS. 2000. The history, present status and prospects of the
942 availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181: 397-403.
- 943 LÉGER, P, DA BENGSTON, KL SIMPSON & P SORGELOOS. 1986. The use and
944 nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*,
945 24:521-623.
- 946 LE VAY, L, A RODRIGUEZ, MS KAMARUDIN & DA JONES.1993. Influence of
947 live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus*
948 *japonicus* larvae. *Aquaculture*, 118: 287-297.
- 949 LINK, J. 2002. Does food web theory work for marine ecosystems? *Mar. Ecol. Prog.*
950 *Ser.*, 230: 1-9.
- 951 LIMA-FRANCO, MA, MC CARVALHO & CE REZENDE. 2014. Revisão sobre o uso
952 de ferramentas múltiplas em estudos tróficos de comunidades de peixes. *Neot. Biol.*
953 *and Conserv.*, 9(3):172-185.
- 954 LOPES, DLA, SM SUITA, C BUENO, W WASIELESKY & LH POERSCH. 2012.
955 Determinação da densidade de estocagem ótima do camarão rosa *Farfantepenaeus*
956 *brasiliensis* produzido em tecnologia de bioflocos durante a fase de berçário.
957 *Atlântica*, 34(2):113-120.
- 958 MARCOLIN, C da R, CRG CARQUEIJA, S de O TOZETTO, DV OLIVEIRA &
959 AMA CÔRREA. 2008. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides*
960 *cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos
961 estádios de intermuda e pré-muda inicial. *Rev. Brasil. de Zooc.*, 10(2): 97-104.
- 962 MARTINEZ-ROCHA, L, J GAMBOA-DELGADO, M NIETO-LÓPEZ, RICQUE-
963 MARIE D & LE CRUZ-SUÁREZ. 2013. Incorporation of dietary nitrogen from
964 fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific White shrimp
965 *Litopenaeus vannamei* fed low protein compound diets. *Aquac. Res.*, 44:847-859.

966 MOSS, KRK & SM MOSS. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on
967 the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Jour. of*
968 *World Aquac. Soc.*, 35(4):536-542.

969 NAYLOR, RL, RW HARDY, DP BUREAU, A CHIU, M ELLIOT, AP FARRELL, I
970 FORSTER, DM GATLIN, RJ GOLDBURG, K HUA & PD NICHOLS. 2009.
971 Feeding aquaculture in an era of finite resource. *Proc. of the Nat. Acad. of Scienc.*
972 *of the Unit. States America* (PNAS), 106(42): 36p.

973 NUNES, AJP, RM MADRID & TP ANDRADE. 2011. Carcinocultura Marinha no
974 Brasil: Passado, Presente e Futuro. *Revista Panorama da Aquicultura*. Edição 124.
975 Março/Abril, p. 26-33.

976 PALÁCIOS, E & IS RACOTTA. 2007. Salinity stress test and its relation to future
977 performance and different physiological responses in shrimp postlarvae.
978 *Aquaculture*, 268: 123-135.

979 PARNELL, A, R INGER, S BEARHOP & AL JACKSON. 2010. Source partitioning
980 using stable isotopes: coping with too much variation. *PlosOne*, 5 (3).

981 PEARSON, DF, DJ LEVEY, CH GREENBERG & C MARTINEZ DEL RIO. 2003.
982 Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and
983 carbón isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia*, 135:516–523.

984 PETERSON, BJ & B FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Eco.*
985 *Syst.*, 18, 293-320.

986 PHILIPS, DL. 2012. Converting isotope values to diet composition: the use of mixing
987 models. *Jour.of Mamm.*, 93(2):342-352.

988 PHILLIPS, DL, R INGER, S BEARHOP, AL JACKSON, JW MOORE, AC
989 PARNELL, BX SEMMENS & EJ WARD. 2014. Best practices for use of stable
990 isotope mixing models in food-web studies. *Can. Jour. of Zool.*, 92: 823-835.

- 991 RACOTTA, IS, E PALÁCIOS, R HERNÁNDEZ-HERRERA, A BONILLA, CI
992 PÉREZ-ROSTRO & JL RAMÍREZ. 2004. Criteria for assessing larval and
993 postlarval quality of Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*,
994 233: 181–195.
- 995 ROCHA, I, M BORBA & J NOGUEIRA. 2013. O censo da carcinocultura mundial em
996 2011. *Revista Panorama da Aquicultura*. Maio/Junho. Edição 137, p. 26-33.
- 997 SAMOCHA, TM, H GUAJARDO, AL LAWRENCE, FL CASTILLE, M SPEED, DA
998 MCKEE & KI PAGE. 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* post-larvae.
999 *Aquaculture*, 165: 233–242.
- 1000 SCHWAMBORN, R & MM CRIALES. 2000. Feeding strategy and daily diet of
1001 juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in South Florida seagrass bed.
1002 *Marine Biol.*, 137:139-147.
- 1003 SERRA, FP, CA GAONA, PS FURTADO, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2015.
1004 Use of diferente carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery
1005 and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, DOI
1006 10.1007/s10499-015-9887-6 (Publicado Online 11 Fevereiro 2015).
- 1007 SREERAM, MP & NR MENON. 2005. Histopathological changes in the
1008 hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* exposed to petroleum
1009 hydrocarbons. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 47(2): 160-168.
- 1010 SILVA, CF, ELC BALLESTER, J MONSERRAT, L GERACITANO, W
1011 WASIELESKY & PC ABREU. 2008. Contribution of microorganisms to the
1012 biofilm nutrition quality: protein and lipid contents. *Aquac. Nutrit.*, 14: 507-514.
- 1013 SILVA, KR, W WASIELESKY & PC ABREU. 2013. Nitrogen and Phosphorus
1014 Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White shrimp, *Litopenaeus*
1015 *vannamei*. *Jour. of the World Aquac. Soc.*, 44(1):30-41.

1016 SOARES, RB, S PEIXOTO, W WASIELESKY, & F D`INCAO. 2005. Feding rythms
1017 and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary,
1018 Brazil. *Jour. of Exper. Mar. Biol. and Ecol*, 322:167-176.

1019 SOARES, RB, S PEIXOTO,W WASIELESKY & F D`INCAO. 2006. Effect of
1020 different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis*
1021 postlarvae. *Aquaculture Research*, 37:1413-1418.

1022 SOUZA, MD, SM SUITA, FPL LEITE, LA ROMANO, W WASIELESKY & ELC
1023 BALLESTER. 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink
1024 shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system.
1025 *Aquac. Res.*, 43:1828-1837.

1026 SORGELOOS, P, P DHERT & P CANDREV, 2001.Use of the brine shrimp, *Artemia*
1027 spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200:147-159.

1028 SOUTHGATE, PC & GJ PARTRIDGE. 1998. Development of artificial diets for
1029 marine finfish larvae: problems and prospects. In: de Silva, SS (Ed), *Tropical*
1030 *Mariculture*. Academic Press, London, UK, pp. 151-170.

1031 SUITA, SM, LA ROMANO, AP CARDOZO, PC ABREU & W WASIELESKY.
1032 2015a. Development of the hepatopancreas and quality analysis of postlarvae
1033 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. *Aquac. Int.*,
1034 23:449-463.

1035 SUITA, SM, ELC BALLESTER, PC ABREU & W WASIELESKY. 2015b. Dextrose
1036 as carbon source in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero
1037 exchange system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, (43)3.

1038 TAYAMEN, M & JH BROWN. 1999. A condition index for evaluating larval quality
1039 of *Macrobrachium rosebergii* (de Man 1879). Short communication.
1040 *Aquaculture Research*, 30:917-922.

1041 TREECE, GD. 2000. *Artemia* production for Marine Larval fish culture. Southern
1042 regional aquaculture Center. N^o 702.

1043 THOMPSON, RL, PC ABREU & W WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for
1044 water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203:263-
1045 278.

1046 WASIELESKY, W, HI ATWOOD, A STOKES & CL BROWDY. 2006. Effect of
1047 natural production in brown water super-intensive culture system for Pacific white
1048 shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396-403.

1049 WANG, FI & JC CHEN. 2006. The immune response of tiger shrimp *Penaeus*
1050 *monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* under
1051 temperature stress. *Aquaculture*, 258:34-41.

1052 ZHUKOVA, NV & VI KHARLAMENKO. 1999. Sources of essential fatty acids in the
1053 marine microbial loop. *Aquat. Mic. Ecol.*, 17:153-157.

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

CAPÍTULO I

1066

1067

1068 DESENVOLVIMENTO DO HEPATOPÂNCREAS E ANÁLISE DE QUALIDADE

1069 DE PÓS-LARVAS DO CAMARÃO-BRANCO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*

1070

PRODUZIDOS EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

1071

1072

1073

Sabrina Medeiros Suita

1074

Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

1075

Cx. Postal 474, CEP:96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

1076

smsuita@yahoo.com.br

1077

1078

1079

1080

1081 Artigo publicado na Revista Aquaculture International (v. 23, p.449-463, 2015)

1082

1083

1084

1085

1086 **RESUMO**

1087 A produção de camarões marinhos em sistemas de bioflocos é uma prática
1088 sustentável de baixo impacto ambiental a qual pode beneficiar o sistema pela
1089 manutenção da qualidade de água, possível aproveitamento da comunidade microbiana
1090 como recurso alimentar além do efeito positivo na síntese de enzimas digestivas
1091 produzidas pelo hepatopâncreas. O objetivo do presente estudo foi verificar o
1092 desempenho dos organismos, comparando quanto ao tamanho (mm), ganho de peso (g)
1093 e sobrevivência (%), os indicadores de qualidade final de pós-larvas, teste de estresse
1094 para temperatura e salinidade, além de observações histológicas quanto à área total e
1095 diâmetro dos túbulos do hepatopâncreas de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus*
1096 *vannamei*, produzidos em sistema BFT na fase de berçário. Foram realizados dois
1097 experimentos, BI (PL1 a PL15; 75 PL's/L) e BII (PL16 a PL30; 50 PL's/L), ambos com
1098 um tratamento controle simulando um berçário tradicional com renovação de água e
1099 outro denominado de biofloco, sem renovação de água e fertilizações orgânica com
1100 dextrose a cada vez que o nitrogênio amoniacal ultrapassou a concentração de 0,5 mg/L.
1101 Diariamente foram realizadas análises de qualidade de água. O melhor desempenho de
1102 produção e qualidade final foi observada no tratamento Biofloco em ambos
1103 experimentos. As análises da área total do hepatopâncreas apresentaram diferença
1104 estatística entre os tratamentos no experimento BI, enquanto as medidas da espessura
1105 dos túbulos apresentaram diferença estatística entre os tratamentos no experimento BII.
1106 Em ambos experimentos os túbulos do hepatopâncreas do tratamento Biofloco
1107 apresentaram maior espessura e com aparente maior quantidade de células produtoras
1108 de enzimas (Células B) do que o tratamento controle. Os resultados do presente estudo
1109 sugerem que a fase de berçário desenvolvida em meio à bioflocos quando comparados a
1110 sistemas convencionais de produção, pode ser mais vantajosa por gerar benefícios

1111 quanto ao desempenho, qualidade de pós-larvas e melhor condição nutricional, neste
1112 estudo, usando como indicador a estruturação dos túbulos hepatopancreáticos com
1113 maior espessura de paredes e área melhor delimitada.

1114 **Palavras-chave:** Bioflocos, berçário, camarão, dextrose, hepatopâncreas.

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131 *Litopenaeus vannamei* post-larvae produced in a BFT system

1132

1133 **Development of the hepatopancreas and quality analysis of post-larvae Pacific**

1134 **white shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system**

1135

1136 Sabrina Medeiros Suita, Alessandro Pereira Cardozo, Luis Alberto Romano, Paulo

1137 Cesar Abreu, Wilson Wasielesky*

1138

1139 ¹Marine Station of Aquaculture

1140 Institute of Oceanography

1141 Federal University of Rio Grande

1142 C.P.474-Rio Grande (RS)-CEP 96201-900- Brazil

1143

1144 *Corresponding Author

1145 Tel: +5553 3236-8131

1146 Fax:+5553 3236-8042

1147 E-mail: manow@mikrus.com.br

1148

1149

1150 **ABSTRACT**

1151 The production of marine shrimp in biofloc systems has a low environmental
1152 impact; the shrimp benefit from the maintenance of water quality and possibly utilize
1153 the system's microbial community as a food resource, which also positively affects the
1154 synthesis of digestive enzymes produced by the hepatopancreas. The aim of this study
1155 was to determine the performance, the post-larvae quality indicators and the
1156 development of the hepatopancreas and tubules of post-larvae Pacific white shrimp
1157 *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system during the nursery stage. Two
1158 experiments were conducted: NI (PL1 to PL15; 75 shrimps/L) and NII (PL16 to PL30;
1159 50 shrimps/L). Both experiments included a control treatment simulating a traditional
1160 nursery with water renewal and a biofloc treatment without water renewal but including
1161 organic fertilization with dextrose every time the ammonia nitrogen concentration
1162 exceeded 0.5mgL^{-1} . Daily water quality analyses were performed. The best performance
1163 and the final quality of the production were observed in the biofloc treatment of both
1164 experiments. The total area of the hepatopancreas was significantly different between
1165 treatments in experiment NI, while the thickness of the tubules was significantly
1166 different between treatments in experiment NII. In both experiments, the
1167 hepatopancreas tubules from the biofloc treatment showed increased thickness and an
1168 apparent greater amount of enzyme producing cells (B-cells) than the control treatment.
1169 The results suggest that when compared to conventional production systems, the
1170 bioflocs system may provide better nutritional support, allowing for proper development
1171 of the hepatopancreas, and better nutritional conditions, resulting in healthier post-
1172 larvae shrimp.

1173 Key-words: Biofloc, dextrose, hepatopancreas, nursery, shrimp.

1174

1175 **INTRODUCTION**

1176 The culture of post-larvae in a laboratory setting guarantees biosafety from
1177 diseases that have affected the growth of marine shrimp in recent decades (FAO 2004).
1178 Moreover, specialized laboratories can ensure the supply of different strains of
1179 organisms, which leads to the development of pathogen free species (SPF) that promote
1180 healthy productions (Arce et al. 2011). To guarantee biosafety and a high production
1181 quality, a cautious management strategy is needed and should include frequent macro
1182 and microscopic observations as indicators of the quality of the production batch (FAO
1183 2004).

1184 Careful maintenance of appropriate physiological conditions during the early
1185 larval stages will affect the later periods of production (nursery and growth) and
1186 improve growth rates, survival and resistance to pathogens or stress conditions, such as
1187 variations in temperature and salinity (Racotta et al. 2003). In the early stages of
1188 culturing penaeid shrimp, susceptibility to microbial infections is compounded by the
1189 need for high rates of water renewal, which may introduce pathogens (Mishra et al.
1190 2008).

1191 In nursery periods, which are characterized by high stocking densities, high
1192 water exchange, and the use of high quality feed (Mishra et al. 2008), the presence of
1193 certain bacteria can serve as an extra source of food for the shrimp or assist in the
1194 nitrification processes (Vinatea and Andreatta 1997). In addition to acting as probiotics,
1195 the bacteria can further benefit the health of cultured shrimp by improving the overall
1196 water quality (Souza et al. 2012). This microbial colonization can be used as a constant
1197 source of food; therefore, the amount of artificial food needed may be reduced, thus
1198 lowering production costs (Browdy et al. 2001; Avnimelech 2007; Samocha et al.
1199 2007).

1200 For this bacterial biomass to be used by the shrimp, a reduction in the rate of
1201 water renewal is necessary (Emerenciano et al. 2011). These rates are typically very
1202 high during periods of hatchery and nursery, especially between metamorphosis and
1203 post-larvae stages, and reach 100% of the daily total volume (FAO 2004). Production
1204 systems that use minimal water renewal contain a specific type of technology that can
1205 be easily applied to the nursery phase (Mishra et al. 2008). For instance, systems with
1206 the biofloc technology (BFT) stimulate the formation of microbial aggregates which add
1207 a carbon source to the medium and stimulate the growth of heterotrophic bacteria that
1208 utilize the carbon source to convert the ammonia into less toxic compounds for the
1209 shrimp, thus improving the water quality and increasing the production of bacterial
1210 biomass (Avnimelech 1999, Ebeling et al. 2006).

1211 During the early post-larval stage (PL1-PL30), it is difficult to evaluate the
1212 quality of the shrimp based solely on weight gain and survival. Therefore, quality
1213 evaluation of post-larvae reared in the laboratory is performed using a series of macro
1214 and microscopic criteria that may indicate the quality of the production of a particular
1215 batch. These evaluations are called presumptive analysis or analysis quality and, when
1216 combined, may indicate the physiological status of the shrimp (FAO 2004). The
1217 hepatopancreas is a digestive organ composed of blind tubules containing primarily four
1218 types of cells (E, F, B and R) which synthesize, transport, and secrete digestive enzymes
1219 and store lipids, glycogen and minerals (Felgenhauer 1992). Tubule formation and the
1220 size of this organ can be used as indicators of nutritional quality in shrimp (FAO 2004)
1221 because the hepatopancreas is where most of the enzymes required for metabolism are
1222 produced (Cuzón et al. 2004). However, these indicators are unknown for the
1223 hepatopancreas of post-larvae shrimp. Thus, the aim of this study was to determine the
1224 performance of the cultured shrimp, the post-larvae quality indicators and the

1225 development of the hepatopancreas of post-larvae Pacific white shrimp *Litopenaeus*
1226 *vannamei* produced in a BFT system.

1227 **METHODOLOGY**

1228 *Acquiring shrimp*

1229 *Litopenaeus vannamei* nauplii were acquired from Aquatec (Rio Grande do
1230 Norte) and transported to the Rio Grande where they were kept from the nauplius stage
1231 V to the post-larval stage in the marine shrimp larviculture at the Federal University of
1232 Rio Grande (EMA-FURG) in Southern Brazil (32°12'S, 51°50'W). This study was
1233 conducted from December 2011 to January 2012.

1234 *Experimental design*

1235 The first experiment, Nursery I (NI), began when the shrimps reached the PL1
1236 stage (first day of the post-larval stage) and ended 15 days later when the shrimps
1237 reached the age of PL15. The second experiment, Nursery II (NII), immediately
1238 followed at PL16 and ended at PL30. Both experiments included two treatments:
1239 control (CT) and biofloc (BT). Five replicates were used for each treatment during the
1240 NI experiment, while four replicates were used during NII. The experimental units used
1241 were cylindrical/conical fiberglass boxes, each with a volume of 10 liters (L). The
1242 stocking density was 75 shrimps L⁻¹ in NI experiment and 50 shrimps L⁻¹ in experiment
1243 NII, which was equivalent to 2,500 and 1,700 shrimps m⁻², respectively.

1244 *Water Treatment and Physicochemical and Biological parameters*

1245 The seawater (salinity 30) used was previously filtered using 25, 5 and 1 µm
1246 filters chlorinated with sodium hypochlorite (15 ppm) and dechlorinated with ascorbic
1247 acid (1.0 ppm). The seawater was then treated with EDTA (20 ppm) to prevent
1248 contamination by heavy metals. The water temperature was maintained close to 30°C.

1249 The salinity was adjusted daily using a supply of freshwater that had been filtered,
1250 treated and heated. Aeration was supplied through three air stones in each tank. In both
1251 experiments the microalgae *Thalassiosira weissflogii* was added upon storage (2×10^4
1252 cells mL⁻¹), counted daily, and replaced when necessary to maintain this initial density.
1253 The probiotic (Pro-w/INVE®) was added daily at a dose of 1.0 ppm.

1254 The dissolved oxygen content (pulse oximetry, HandyLab OXI/SET, Schott),
1255 temperature (mercury thermometer), and pH (DMpH-1, Digimed) were measured daily.
1256 Analyses of total ammonium nitrogen (TAN) were performed every two days (Unesco
1257 1983). Nitrite (NO₂⁻-N), phosphate (PO₄⁻³-P) and alkalinity (mgL⁻¹ CaCO₃) levels were
1258 measured weekly (Strickland and Parsons 1972). The initial and final nitrate (NO₃⁻-N)
1259 concentrations were also analyzed (Strickland and Parsons 1972). Following the
1260 methods of AOAC (2000), the total suspended solids (mgL⁻¹) were determined
1261 gravimetrically by filtering aliquots of 10 mL water using fiber filters GF 50-A (47 ±
1262 0.5 mm) (Schleicher & Schuell).

1263 ***Food, water renewal and organic fertilizations***

1264 During the NI experiment, feed was administered six times daily, twice with live
1265 *Artemia* sp. and four times with a commercial feed INVE® (PL150, Flake and StressPak
1266 300). Six daily feedings were maintained during the NII experiment, changing only the
1267 type of food offered (INVE®/StressPak, and Guabi XL®/PL 40). The levels of water
1268 renewal and organic fertilizer used in each treatment were based on the concentrations
1269 of total ammonia nitrogen (TAN) in the production system. In the CT treatment, when
1270 the concentration of TAN reached 0.5 mgL⁻¹, water renewal was performed for 80% of
1271 the volume of water in the experimental unit. Based on the methods of Ebeling et al.
1272 (2006), the BT treatment was conducted with organic fertilization to form bioflocs using
1273 dextrose as a source of organic carbon (with a 6:1 carbon-nitrogen ratio) when the

1274 concentration of TAN reached 0.5 mg L⁻¹. This N-AT concentration was based on the
1275 level of security for TAN established for post-larvae pink shrimp *Farfantepenaeus*
1276 *paulensis* (Ostrensky et al. 1992).

1277 ***Performance and quality analysis of post-larvae***

1278 Daily samples of 10 organisms of each unit were used for microscopic
1279 observations and then discarded. At the end of each experiment, the survival, body
1280 weight (mg) and length (mm) of post-larvae (n = 20) were measured, and ten shrimps
1281 per unit underwent stress testing for temperature (FAO 2004) and salinity (Samocha et
1282 al. 1998).

1283 The quality analysis of post-larvae followed methods adapted from Lopes et al.
1284 (2012). Fifteen shrimps per replication were evaluated based on the following
1285 parameters: abdomen color (opaque or translucent), hepatopancreas color (dark, pale or
1286 transparent), intestinal peristalsis (absent, low or high), body deformities, muscle
1287 proportion in the gut, melanization in the body, epibiont fouling, filling in the
1288 hepatopancreas tubules, necrosis and deformities in the hepatopancreas tubules and
1289 necrosis in the appendices. Each evaluated parameter was given a score between 0 and 2
1290 points (0 = poor, 1 = good, 2 = excellent), and the sum of these scores was used as the
1291 final score for each post-larva evaluated (Adapted Lopes et al. 2012). The post-larvae
1292 with scores greater than 17 were considered to be of excellent quality, while those with
1293 scores between 8 and 16 were in good quality and those under 7 were considered poor
1294 quality (Table 1).

1295 Table 1. Parameters and criteria score used to analyze the quality of post-larvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NI and
 1296 NII experiments.

Date:		Tank:		Treatment:		Amount of PL's												
Criteria Evaluated	Scores			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	0=Poor	1=Good	2=Excellent															
Color of the abdomen	Opaque		Translucent															
Color of the hepatopancreas	Transparent	Pale	Dark															
Intestinal peristalsis	Absent	Low	Right															
Proportion muscle: gut	≠ 3:1		3:1															
Melanization in the body	51-100%	1-50%	0%															
Necrosis	51-100%	1-50%	0%															
Defects in the hepatopancreas	51-100%	26-50%	0-25%															
Fill the hepatopancreas	0-25%	26-75%	76-100%															
Epibiont fouling	51-100%	1-50%	0%															
Total score																		
Final average																		

1297

1298

adapted from LOPES et al. 2012

1299 Final Rating:

1300 Excellent (17-20 points);

1301 Good (8-16 points);

1302 Poor (0-7 points).

1303 *Morphometric analysis of the hepatopâncreas*

1304 An initial sample of 50 individuals was collected from one of the tanks of the
1305 EMA-FURG hatchery at the beginning of each experiment. To perform histological
1306 analyses, shrimps were fixed in Davidson's solution for 18 hours and preserved in 70%
1307 alcohol. All samples were processed in an automatic tissue processor 05 LUPE PT and
1308 embedded in Paraplast (Sigma). Afterwards, the blocks were cut at 4 μm LUPETEC
1309 MRPO3 microtome and stained with hematoxylin-eosin. Twenty post-larvae from each
1310 treatment were used for morphometric hepatopancreas analyses using the method
1311 described by Weibel (1980). To determine the total area, the hepatopancreas was
1312 measured using a lens (Carl Zeiss) with 20x magnification and the integration of lines 5
1313 and 25 points with the result then set to square millimeters using a conversion factor.
1314 The wall thickness of the tubular hepatopancreas was measured in micrometers with
1315 40x magnification and counted in 10 fields of each individual hepatopancreas.

1316 *Statistical tests*

1317 Differences in growth of shrimp in the two treatments were evaluated by testing
1318 “t” ($\alpha = 0.05$) after the assumptions of homoscedasticity and normal distribution of the
1319 data were verified. Before applying the test, survival data were transformed to arcsine
1320 square root. Significant differences between mean values of morphometric total area
1321 and thickness of the walls of the tubules of the hepatopancreas and quality analysis of
1322 post-larvae of the experiments were verified using nonparametric Kruskal-Wallis tests.

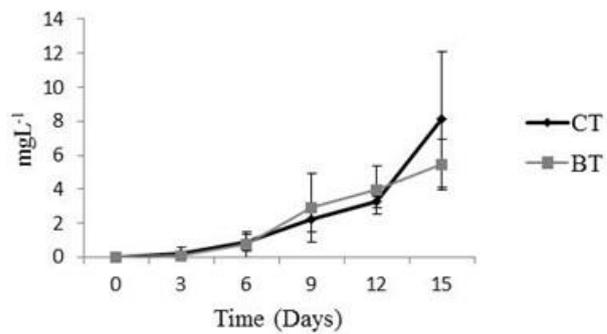
1323 **RESULTS**

1324 *Water Quality*

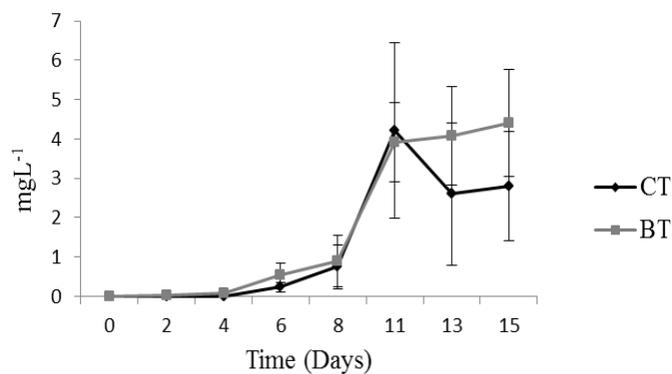
1325 The mean water quality parameters of experiments NI and NII are presented in
1326 Table 2.

1327 Ammonia concentrations increased from the second experimental week, and
1328 despite having slightly different values in the final period (Figures 1 and 2) of NI and
1329 NII, respectively, no significant differences were observed between treatments in both
1330 experiments.

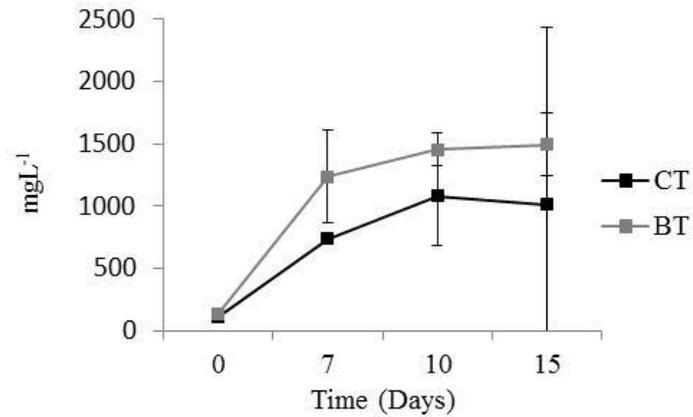
1331 The suspended solids concentrations were elevated in both experiments (NI and
1332 NII) with values above 500 mg L⁻¹ (Figures 3 and 4) respectively; however, significant
1333 differences between the treatments were only observed on the fifteenth day of the NII
1334 experiment.



1335
1336 Figure 1. Values (mean ± SD) of total ammonia (N-AT) in the production of Pacific
1337 white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NI experiment.

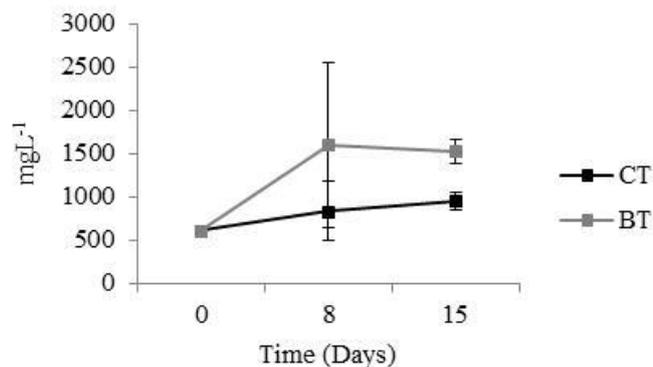


1338
1339 Figure 2. Values (mean ± SD) of total ammonia (TAN) in the production of Pacific
1340 white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NII experiment.



1341

1342 Figure 3. Values (mean \pm SD) of suspended solids (mg L^{-1}) in the production of Pacific
 1343 white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NI experiment.



1344

1345 Figure 4. Values (mean \pm SD) of suspended solids (mg L^{-1}) in the production of Pacific
 1346 white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NII experiment.

1347 ***Performance and Analysis of quality of the post-larvae***

1348 As for the growth performance of shrimp, survival and final biomass showed
 1349 significant differences in experiment NI. In experiment NII statistical difference was
 1350 observed only in final lengths (Table 3).

1351 The final evaluation of post-larvae quality obtained by the total score of the
 1352 parameters resulted in GOOD ratings for CT treatments and EXCELLENT ratings for
 1353 BT treatments for both NI and NII experiments. In the NI experiment, treatments were
 1354 significantly different ($p < 0.05$), and the CT treatment showed a higher amount of post-

1355 larvae with abdominal opacity, high body melanization percentages and increased
 1356 presence of necrosis in appendices.

1357 In the NII experiment, significant differences were detected between treatments;
 1358 the BT treatment resulted in higher intestinal peristalsis. Additional results of
 1359 experiments NI and NII such as zootechnical parameters and post-larvae quality are
 1360 shown in Table 3.

1361 Table 2. Values (mean \pm SD) of physicochemical variables of water quality of post-
 1362 larvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NI and NII experiments.

	N I		N II	
	CT	BT	CT	BT
Temperature ($^{\circ}$ C)	30,5 \pm 0,22	30,66 \pm 0,81	30 \pm 1,05	30 \pm 1,07
Dissolved Oxygen (mgL $^{-1}$)	5,49 \pm 1,72 ^a	5,17 \pm 1,46 ^b	5,08 \pm 0,82	4,87 \pm 0,98
pH	8 \pm 0,01	7,92 \pm 0,11	7,97 \pm 0,059 ^a	7,92 \pm 0,086 ^b
Alkalinity (CaCO ₃)	188,33 \pm 9,3	175,83 \pm 13,93	175 \pm 9,35	163 \pm 5,7
Salinity	31,66 \pm 1,03	31,83 \pm 1,17	29 \pm 1,2 ^a	31 \pm 1,7 ^b
Suspended solids (mgL $^{-1}$)	735,62 \pm 443,92	1080,75 \pm 643,2	806,33 \pm 145,35 ^a	1252,66 \pm 361,76 ^b
Total ammonia (N-AT)	2,45 \pm 3,04	2,21 \pm 2,25	1,32 \pm 1,64	1,74 \pm 2
N-NO ₂ $^{-}$	0,048 \pm 0,075 ^a	0,07 \pm 0,095 ^b	0,021 \pm 0,03 ^a	0,01 \pm 0,01 ^b
N-NO ₃ $^{-}$	n.d	n.d	n.d	n.d**
P-PO ₄ $^{3-}$	1,26 \pm 1,48	1,75 \pm 1,75	0,34 \pm 0,31	0,57 \pm 0,73

1363 * Different letters in the same row mean significant difference between treatments
 **n.d (concentrations not detected)

1364 Table 3. Values (mean \pm SD) performance parameters and quality of post-larvae of the
 1365 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the NI (a) and NII (b) experiments.

	NI		NII	
	<i>Growth Performance</i>			
	CT	BT	CT	BT
Survival (%)	70,81±2,25 ^a	88,76±5,8 ^b	80,62±13,36	95,75±2,22
Survival of salt stress test (%)	98±4,47	100±0	100±0	100±0
Initial weight (mg)	5±1	5±1	10±2	10±2
Final Weight (mg)	9,4± 2,8	13±3	19±5	23±3
Initial length (mm)	7±1,3	7±1,3	12,7±0,98	12,7±0,98
Final length (mm)	12,6±1,19	13,02±1	14,22±1,49 ^a	19,4±0,8 ^b
Final biomass (g)	1,81±1,16 ^a	4,4±1,6 ^b	8,28±3,55	11,62±2,17
	<i>Post-larvae Quality</i>			
Abdominal opacity	1,25±0,7 ^a	1,9±0,11 ^b	1,28±0,7	1,6±0,28
Color of hepatopancreas	2±0	1,98±0,05	1,93±0,09	1,95±0,1
Intestinal peristalsis	1,78±0,09	1,83±0,15	1,65±0,25 ^a	2±0 ^b
Deformities in the body	1,75±0,17	1,85±0,19	1,7±0,11	1,9±0,11
Muscle: Gut	1,25±0,68	1,6±0,43	1,7±0,25	1,95±0,1
Melanization in the body	1,07±0,47 ^a	1,55±0,24 ^b	1,85±0,1	1,7±0,4
Necrosis in appendices	1,55±0,52 ^a	1,98±0,05 ^b	1,68±0,09	1,85±0,24
Hepatopancreas tubular deformity	1,97±0,05	1,98±0,05	1,7±0,09	1,95±0,1
Fill Hepatopancreas	1,95±0,05	2±0	2±0	2±0
Fouling epibionts	1,28±0,3	1,3±0,14	1,28±0,43	1,43±0,38
Total score	16±1,58	17,95±0,52	16,8±1,22	18,31±0,72
Final evaluation of quality	Good	Excellent	Good	Excellent

*Different letters in the same row mean significant difference between treatments

1366

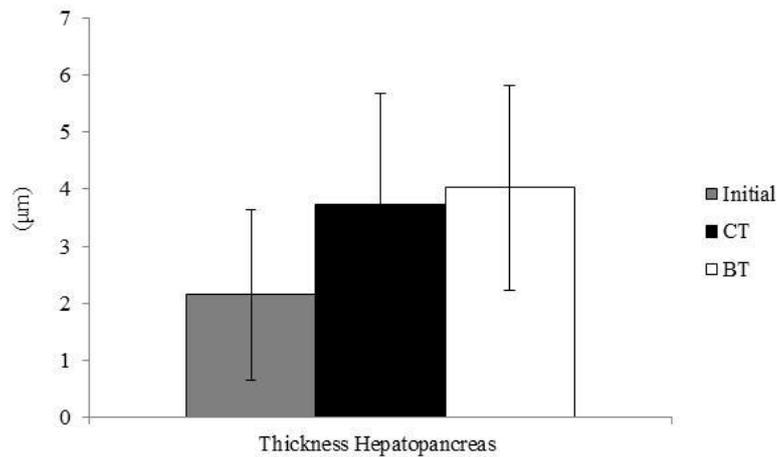
1367 *Morphometric analysis of the Hepatopancreas*

1368 The total area of the hepatopancreas was significantly different between
1369 treatments in the NI experiment; there was an increase in the final area when compared
1370 to the initial sample (Figure 5). In the NII experiment, no differences between
1371 treatments or between the final and the initial samples (Figure 6) were observed.

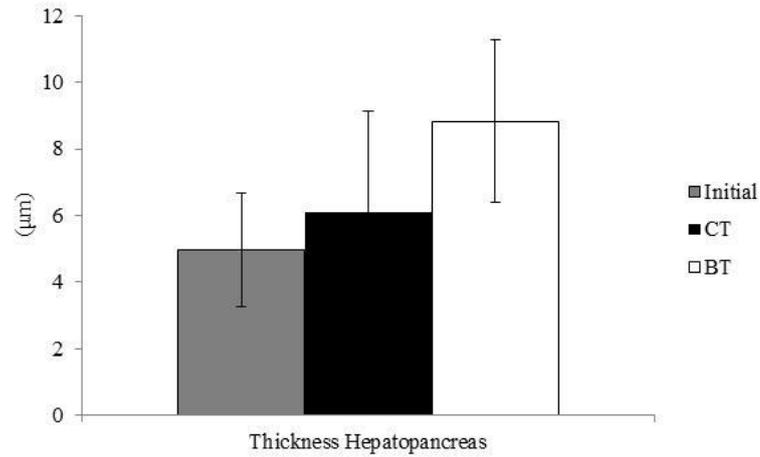
1372 Images of the total area of the hepatopancreas (initial and final images from
1373 experiments NI and NII are presented in Figure 7 (a, b and c) respectively.

1374 No method was used to quantify the hepatopancreas cells; however, there was a
1375 probable distinction between treatments in the presence of B-cells. In the NI
1376 experiment, the average wall thickness of the hepatopancreas tubules showed no
1377 significant differences between treatments and the initial values. However, the average
1378 wall thickness in BT showed slightly higher values (Figure 8). In the NII experiment,
1379 the results from CT and BT treatments were significantly different (Figure 9); however,

1380 wall thickness from the CT treatments did not differ from the original sample on the last
1381 experimental day while BT treatments resulted in significantly thicker walls and lumen
1382 with a greater amount of material secreted. In both experiments, the tubules from the
1383 BT treatments showed a more defined shape with NI experiment, resulting in a larger
1384 amount of B-cells than CT. Figure 10 presents the images of the total area of the
1385 hepatopancreas from the NII experiment in initial and final images from CT and BT.
1386 The images showing the thickness of the walls of the tubules in the hepatopancreas
1387 from the NI and NII experiments are shown in Figures 11 and 12, respectively, with
1388 arrows indicating the B-cells.

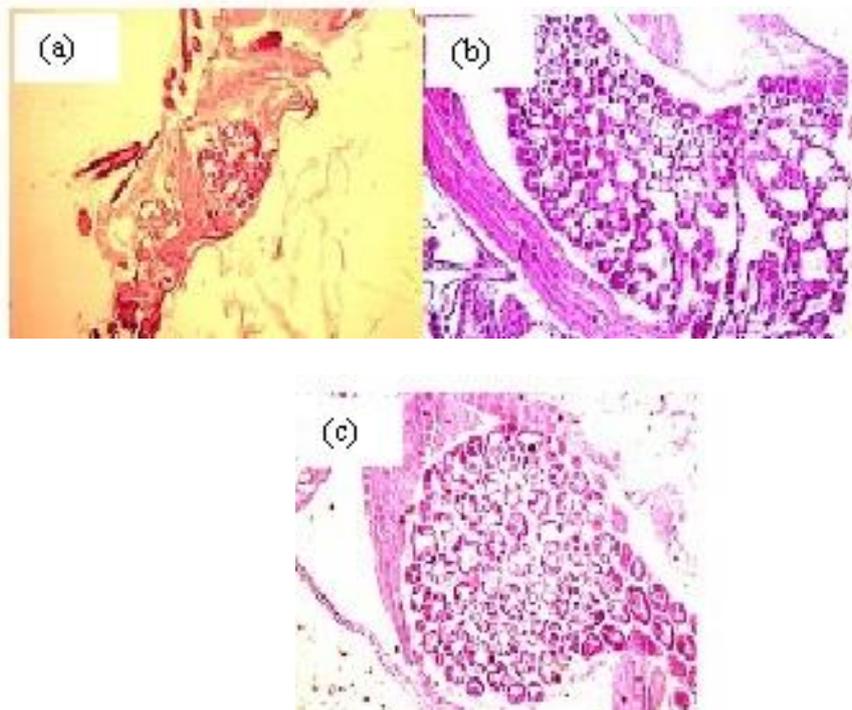


1389 Figure 5. Morphometric averages of the total area of the hepatopancreas in the
1390 production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* for the Initial sample, TC and
1391 TB treatments in the NI experiment.



1393

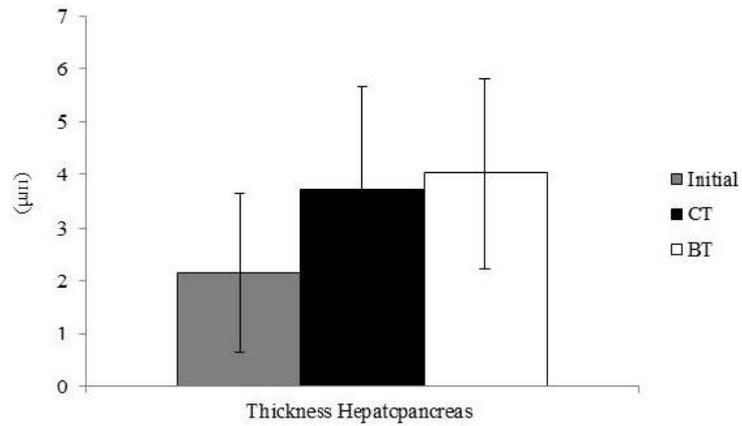
1394 Figure 6. Morphometric averages of the total area of the hepatopancreas in the
 1395 production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* for the Initial sample, TC and
 1396 TB treatments in the NII experiment.



1397

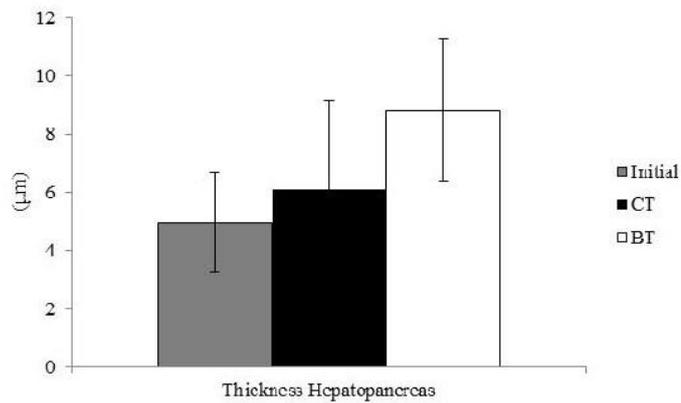
1398

1399 Figure 7. Images of the total area of the hepatopancreas of post-larvae Pacific white
 1400 shrimp *Litopenaeus vannamei* in NI experiment where: (a) initial sample, (b) Final CT
 1401 and (c) end TB (up to 10x) (Scale= 100µm).



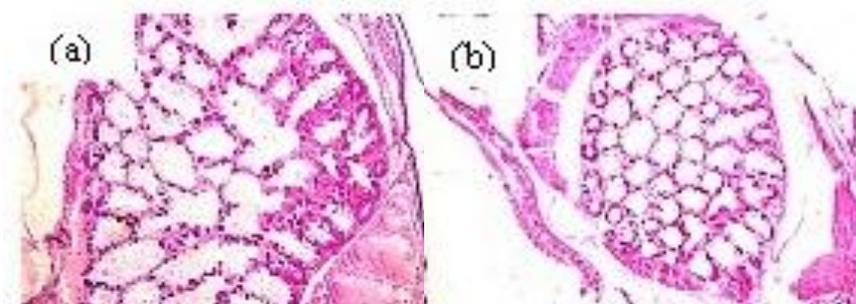
1402

1403 Figure 8. Morphometric mean (\pm SD) of the wall thickness of the hepatopancreas in the
 1404 production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* for the Initial sample, TC and
 1405 TB treatments in the NI experiment.



1406

1407 Figure 9. Morphometric mean (\pm SD) of the wall thickness of the hepatopancreas in the
 1408 production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* for the Initial sample, TC and
 1409 TB treatments in the NII experiment.



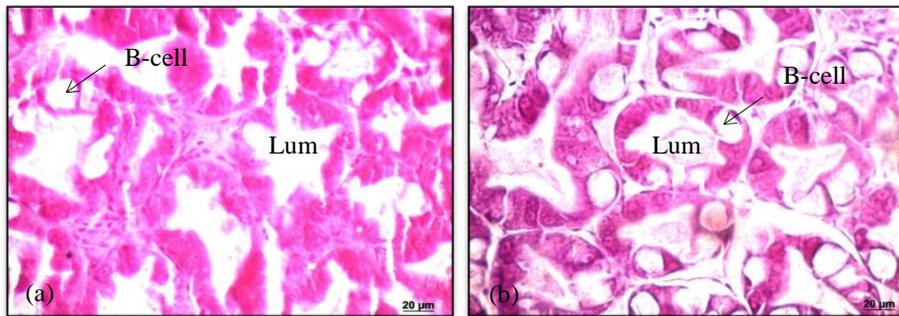
1410

1411



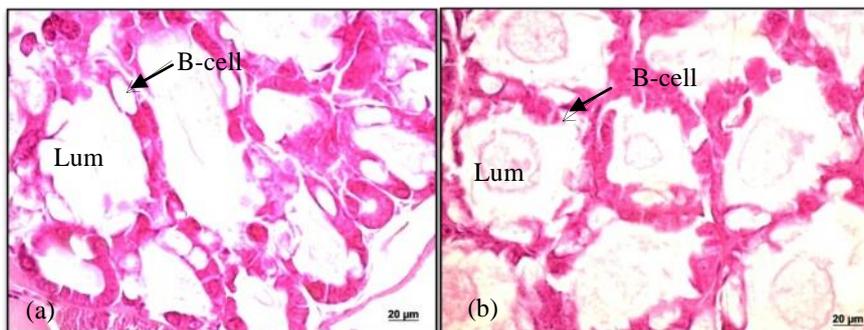
1412

1413 Figure 10. Images of the total area of the hepatopancreas of post-larvae Pacific white
 1414 shrimp *Litopenaeus vannamei* in NII experiment where: (a) initial sample, (b) Final CT
 1415 and (c) end BT (up to 10x) (Scale= 100µm).



1416

1417 Figure 11. Images of the wall thickness of the tubules of the hepatopancreas of post-larvae
 1418 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in NI experiment where: (a) Final CT and (b)
 1419 end BT (40x magnification). The arrows point to B-cells, Lum = Lumen.



1420

1421 Figure 12. Images of the wall thickness of the tubules of the hepatopancreas of Pacific
 1422 white shrimp *Litopenaeus vannamei* in NII where experiments: (a) Final CT and (b) end
 1423 BT (40x magnification). The arrows point to B-cells, Lum = Lumen.

1424 **DISCUSSION**

1425 In biofloc systems, microorganisms immobilize nitrogen that may be toxic to the
1426 organisms produced (Avnimelech 1999). In both experiments, when the ammonia
1427 concentration reached 0.5 mgL^{-1} , it was started procedures for its control. These
1428 procedures kept ammonia concentration below recommended safe level for this species
1429 (3.55 mgL^{-1} TAN at salinity 25) (Lin and Chen 2001). These concentrations may reflect
1430 the high water temperatures which the shrimps were exposed. These high temperatures
1431 may have caused a greater metabolic response, and consequently, increased of food
1432 intake, generating ammonia as a by-product of protein metabolism (Kirchman 1994).

1433 The higher ammonia concentrations from the NI treatments may also be
1434 attributed to higher crude protein provided by the commercial feed (approximately 50 %
1435 of PB) (Mishra et al. 2008) and the daily supply of *Artemia* sp. nauplii, which also
1436 excretes ammonia. Furthermore, the immaturity of bioflocs must be taken into
1437 consideration because the experimental time (15 days for NI) was relatively brief for an
1438 efficient full maturation in flake microbial conversion of ammonia nitrogen (TAN)
1439 protein.

1440 For shrimp production in a bioflocs system, the concentrations of total
1441 suspended solids should not exceed 500 mgL^{-1} (Ray et al. 2010; Gaona et al. 2011).
1442 Both experiments in this study resulted in concentrations above the recommended limit,
1443 but the concentration of solids was different for the different treatments ($p < 0.05$). BT
1444 treatments showed higher concentrations in both experiments. However, the method of
1445 verification of total suspended solids by filtration of water may not have been effective
1446 for this stage of production. Probably because phytoplankton and *Artemia* sp. nauplii
1447 were frequently added at this stage.

1448 In the present study the best growth rates, weight gain and survival rates were
1449 recorded in the BT treatment for both experiments. These results may be related to the
1450 better physiological state of these shrimps primarily due to better development of
1451 hepatopancreases which were confirmed by the morphometric analyzes of this organ.
1452 Furthermore, the microorganisms in bioflocs can be considered a good source of natural
1453 food, supplementing the artificial food supplied, and are available 24 hours a day in this
1454 BFT production system (Browdy et al. 2001; Samocha et al. 2007). It is known that *L.*
1455 *vannamei* post-larvae can feed on bioflocs and this consumption may represent more
1456 than 29% of the daily food intake (Burford et al. 2004). Thus, the better performance
1457 indices and development in the hepatopancreas from the BT treatments (NI and NII)
1458 may be associated with the essential nutrients, such as amino acids, vitamins and
1459 minerals, present in the bioflocs (Decamp et al. 2002). Xu et al. (2013) suggest that the
1460 constituents of microorganism bioflocs to be preyed upon by the shrimp would release
1461 digestive enzymes already prepared for the digestive tract of shrimps to assist in
1462 nutritional quality.

1463 Arnold et al. (2006) consider survival as the main parameter to be considered in
1464 *Penaeus monodon* nursery systems. Although our results suggest that survival and size
1465 are key indicators of the quality of post-larvae, other parameters are conventionally used
1466 in the commercial sector to distinguish quality standards. These parameters include
1467 swimming activity, body pigmentation, abdominal opacity, the presence of epibiont
1468 organisms in the body and appendages and the presence of deformities or necrosis
1469 (Samocha and Lawrence 1992). Another way to evaluate the quality of post-larvae is
1470 via a stress test that measures the resistance of post-larvae to abrupt variations in
1471 salinity or temperature. Samocha (1998) suggests that *L. vannamei* post-larvae become

1472 more resistant to salinity variations after the seventh day (PL7), thus justifying the high
1473 percentages of survival through the stress test in both experiments.

1474 A good performance in the stress test may indicate an animal's future
1475 performance (Samocha et al. 1998). Although Lin (1993) noted that the osmoregulatory
1476 capacity of shrimps decreases with increasing concentrations of ammonia in the
1477 environment, ammonia concentrations in this study did not affect the ability of
1478 osmoregulation of organisms produced, except in the CT treatment of the NI experiment
1479 where a lower response to the stress test may have been a result of higher concentrations
1480 of ammonia in this treatment. In experiment NI post-larvae showed significant
1481 differences ($p < 0.05$) between CT treatments resulting in a higher percentage of
1482 organisms with abdominal opacity and melanization in the body. Based on the criteria
1483 of FAO (2004), abdominal opacity and melanization are indicative of quality problems
1484 of post larvae. Furthermore, the presence of necrosis was significantly greater in this
1485 treatment. Water renewals are known to be the major source of introduction of disease
1486 in shrimp production (Lotz and Lightner 1999); however, renewals prevent the
1487 accumulation of organic matter in the environment and, thus, maintain good water
1488 quality. Poor water quality in conjunction with failures in stocking density or problems
1489 with the administration of food can cause tissue necrosis in appendices or tissues, which
1490 increases the risk of secondary infections (FAO 2004). In this experiment (NI), a higher
1491 percentage of organisms with necrosis were observed in the CT treatment, indicating
1492 that bioflocs not only influenced the improvement of nutritional status, but also reduced
1493 the occurrence of necrosis. So it is possible to use higher stocking density, above
1494 recommended for this stage of development.

1495 The presence of epibiont organisms parasitizing the carapace of post-larvae was
1496 found in both experiments and treatments but with no significant differences ($p > 0.05$)

1497 between treatments or experiments. We note that the presence of these organisms had
1498 no effect on the quality of post-larvae of BT treatments because even without renewals
1499 of water, there could have been a process of infestation most likely by the constituent
1500 microbial community of bioflocs.

1501 A low intensity of the intestinal peristaltic movements may occur due to lesions
1502 in the intestinal wall caused by parasites or difficulties in absorption of food (FAO
1503 2004). The significant difference detected between treatments for NII experiment point
1504 to a reduced intestinal peristalsis in treatment CT. This result may be related to the poor
1505 development of the hepatopancreas in this treatment.

1506 The observation of the hepatopancreas may indicate the functional activity of
1507 this organ (Bell and Lightner 1988), and although this type of assessment is not yet used
1508 in trade, it can serve as an additional method to investigate the "nutritional status" of the
1509 organisms. In the present study, observations of the hepatopancreas were different
1510 between the post-larvae "*in vivo*" and morphometric. In the CT treatment of experiment
1511 NI, the features observed by morphometric analyses (i.e., slightly thinner wall of the
1512 tubules and a larger area of the hepatopancreas) cannot be detected by routine analysis
1513 of the quality of post-larvae. Thus, the conventional analysis used in the commercial
1514 sector cannot accurately show the quality of post-larvae when each parameter is
1515 observed in isolation.

1516 In the BT treatment in NII experiment, the tubules had thicker walls in addition
1517 to a larger amount of material secreted into the lumen, indicating a higher activity of the
1518 digestive organ. The B-cells of the hepatopancreas predominantly produce and secrete
1519 digestive enzymes (Felgenhauer 1992). Although no specific method was used to
1520 measure the presence of cells in the hepatopancreas (E, F, R, and B), we observed a
1521 clear distinction between the treatments and the presence of B-cells, especially in the NI

1522 experiment. This suggests that the post-larvae produced amid bioflocs have greater
1523 functionality of this organ, especially among post-larval stages 1 and 15. The results of
1524 this study support the findings of Moss et al. (2001), which indicated that the use of
1525 natural productivity as a food resource may trigger greater functional activity in the
1526 hepatopancreas via a higher production of specific enzymes.

1527 The proportion of muscle in the gut is another relevant parameter for assessing
1528 post-larvae quality. This proportion should be maintained in a 3:1 ratio and is also an
1529 indicator of adequate nutritional status (Peregrino 2006). Although treatments have not
1530 shown significant differences in this parameter, in experiment NII, the post-larvae of the
1531 BT treatment showed a better average muscle, indicating that bioflocs can serve as a
1532 nutritional supplement for the species during this stage of life and corroborating the
1533 morphometric hepatopancreas data already presented in this study. Previous studies of
1534 *L. vannamei* in the nursery phase in bioflocs systems reported on benefits to shrimp
1535 including enhanced growth and increased survival (Samocha et al. 2007).

1536 Although the experimental period may not have been sufficient for full
1537 maturation of bioflocs, the suspension of renewals of water treatments using bioflocs
1538 generated economic and environmental advantages by limiting supply and release of
1539 water. Moreover, this system enabled the production of healthy post-larvae when
1540 considering all parameters as a set including zootechnical performance, quality analysis
1541 of post-larvae and morphometry of the hepatopancreas. The results of this study suggest
1542 that the nursery developed amid bioflocs, especially from the PL1 stage, can generate
1543 economic and environmental benefits and produce healthy post-larvae.

1544 **CONCLUSIONS**

1545 The use of bioflocs for post-larval metamorphosis 1 is beneficial to the
1546 production of *Litopenaeus vannamei*. The bioflocs provide nutritional support, which

1547 allows for proper development of the hepatopancreas and better nutritional condition
1548 resulting in post-larvae of better quality.

1549 Nevertheless, further studies should be conducted to investigate the possible
1550 presence of lesions caused by pathogenic organisms in this organ. In addition, longer
1551 studies are needed to assess possible differences in the response of biofloc organisms
1552 created from PL1 at the time of fattening.

1553 **ACKNOWLEDGEMENTS**

1554 The authors are grateful for the financial support provided by the National
1555 Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Fishery and
1556 Aquaculture (MPA) and Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel
1557 (CAPES). W.Wasielesky Jr., L.A. Romano and P.C. Abreu are research fellows of CNPq.

1558 **REFERENCES**

1559 Arnold S J, Sellars M J, Crocos P J & Coman G J (2006) An evaluation of stocking
1560 density on the intensive production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus*
1561 *esculentus*). *Aquaculture* 256:174–179

1562 AOAC (2000) Official Methods of Analysis of AOAC, 16ed. Patricia Cunniff (ed),
1563 Washington, DC.

1564 Avnimelech Y (1999) C/N ratio as a control element in aquaculture systems.
1565 *Aquaculture* 176: 227-235

1566 Avnimelech Y (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge
1567 bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264:140–147

1568 Bell TA & Lightner D (1988) Manual de Histología del camarón *Penaeus* normal.
1569 World Aquaculture Society. Baton Rouge, USA.

- 1570 Browdy CL, Bratvold D, Stokes AD, McIntosh RP (2001) Perspectives on the
1571 application of closed shrimp culture systems. In: Browdy CL & Jory DE (eds.).
1572 The new wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp
1573 Culture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 20-34
- 1574 Burford MA, Sellars MJ, Arnold SJ, Keys SJ, Crocos PJ, Preston NP (2004)
1575 Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional
1576 requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-
1577 density rearing systems. *Aquaculture Research* 35:508–515
- 1578 Chin TS, Chen JC (1987) Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn
1579 *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66: 247–253
- 1580 Cuzón G, Lawrence A, Graxiola G, Rosas C. & Guillaume J (2004) Nutrition of
1581 *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235: 513-551
- 1582 Decamp O, Conquest L, Forster I & Tacon AGJ (2002) The nutrition and feeding of
1583 marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production system: role of
1584 Eukaryotic microorganisms. In: *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition*
1585 *within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems* (Lee, C.S. &
1586 O_Bryen, P.eds). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. pp. 79–86.
- 1587 De La Peña LD, Nakai T, Muroga K (1995) Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of
1588 orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* 30: 39–45
- 1589 Ebeling JM, Timmons MB, Bisogni JJ (2006) Engineering analysis of the stoichiometry
1590 of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in
1591 aquaculture production systems. *Aquaculture* 257: 346-358
- 1592 Emerenciano, M, Ballester ELC, Cavalli, RO & Wasielesky W (2011) Effect of biofloc
1593 technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus*

1594 *paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance.
1595 Aquaculture International 19:891-901

1596 FAO (2004) Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratórios de
1597 postlarvas del camarón (*Penaeus vannamei*) em America Latina. Roma:
1598 Documento Tecnico de Pesca. 450p.

1599 Felgenhauer B (1992) Internal anatomy of the decapoda: On overview. In: Microscopic
1600 Anatomy of Invertebrates 10:45-75

1601 Gaona CAP, Poersch L, Krummenauer D, Foes GK, Wasielesky W (2011) The effects
1602 of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei*
1603 in a Biofloc Technology Culture System. International Jour. of Recirc. Aquac.
1604 12:54-73

1605 Kirchman DL (1994) The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria.
1606 Microbiol.Ecol. 28:255–271

1607 Lin H, Thuet P, Trilles JP, Mounet-Guillaume R & Charmantier G (1993) Effects of
1608 ammonia on survival and osmoregulation of various developmental stages of the
1609 shrimp *Penaeus japonicus*. Marine Biology 117: 591–598

1610 Lin Y & Chen J (2001) Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone)
1611 juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and
1612 Ecology 259:109–119

1613 Lopes DLA, Suita S, Bueno C, Wasielesky W, Poersch LH (2012) Determinação da
1614 densidade de estocagem ótima do camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*
1615 produzido em tecnologia de bioflocos durante a fase de berçário. Atlântica
1616 34(2):113-120

1617 Lotz JM, Lightner DV (1999) Shrimp biosecurity: pathogens and pathogen exclusion.
1618 In: Bullis RA, Pruder GD (eds) Controlled and biosecure production systems,

1619 preliminary proceedings of a special integration of shrimp and chicken models.
1620 World Aquaculture Society, Sydney, Australia. pp 70–72

1621 Martins TG, Cavalli RO, Martino RC, Rezende CEM, Wasielesky W (2006)
1622 Larviculture output and stress tolerance of *Farfantepenaeus paulensis* post-larvae
1623 fed *Artemia* containing different fatty acids. *Aquaculture* 252:525-533

1624 Mishra JK, Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Gandy RL, Ali A (2008) Performance of
1625 an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*,
1626 under limited discharge condition. *Aquaculture Engineering* 38:2–15

1627 Moss SM, Divakaran S & Kim BG (2001) Stimulating effects of pond water on
1628 digestive enzyme activity in the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*
1629 (Boone). *Aquaculture Research* 32:125-131

1630 Ostrensky A, Marchiori M, Poersch L (1992) Toxicidade aguda da amônia no processo
1631 produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis* (Perez Farfante. 1967). *An. Acad.*
1632 *Bras. Ci.* 64 (4): 383-389

1633 Ray AJ, Lewis BL, Browdy CL, Leffler JW (2010) Suspended solids removal to
1634 improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-
1635 based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*
1636 299:89–98

1637 Racotta IS, Palacios E, Ibarra AM (2003) Shrimp larval quality in relation to broodstock
1638 condition. *Aquaculture* 227:107–130

1639 Samocha TM, Guajardo H, Lawrence AL, Castille FL, Speed M, Mckee DA, Page KI
1640 (1998) A simple stress test for *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture* 165:
1641 233–242

1642 Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Ali AM, Burger JM, Almeida RV, Ayub Z,
1643 Harisanto M, Horowitz A, Brock DL (2007) Use of molasses as carbon source in

1644 limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*.
1645 Aquacult. Eng., 36:184–191

1646 Samocha TM, Lawrence AL (1992) Shrimp nursery systems and management. In:
1647 Wyban J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World
1648 Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 87–105

1649 Souza MD, Suita SM, Leite FPL, Romano LA, Wasielesky W, Ballester ELC (2011)
1650 The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp
1651 *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system.
1652 Aquaculture Research 43:1828-1837

1653 Strickland JDH & Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis.
1654 Fisheries Research Board of Canada. 2. ed. Ottawa: Bulletin 167. 311p.

1655 UNESCO (1983) Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
1656 Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission.

1657 Vinatea L, Andreatta ER (1997) Comparative study of continuous and state water
1658 renewal strategies in the larviculture of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967)
1659 associated with high stocking and different water renewal rates. Aquaculture
1660 154:247-259

1661 Van Wyk P & Scarpa J (1999) Water Quality and Management. In: Van Wyk P, et al.
1662 (Eds.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida
1663 Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp.128–138

1664 Xu WJ, Pan LQ, Sun XH, Huang J (2003) Effects of bioflocs on water quality, and
1665 survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei*
1666 (Boone), in zero- water exchange culture tanks. Aquaculture Research 44:1093-
1667 1102

- 1668 Wasielesky W, Atwood HI, Stokes A, Browdy CL (2006) Effect of natural production
1669 in brown water super-intensive culture system for Pacific white shrimp
1670 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258: 396-403
- 1671 Weibel, ER (1980) Stereological methods. London Academic 2:253:257
- 1672 Wyban JA, Lee CS, Sato VT, Sweeney JN, Richards JK (1987) Effect of stocking
1673 density on shrimp growth rates in manure-fertilized ponds. Aquaculture 61:23–32

1674 CAPÍTULO II

1675

1676 CONTRIBUIÇÃO DOS BIOFLOCOS PARA A PRODUÇÃO DE PÓS-LARVAS DE

1677 *Litopenaeus vannamei* DETERMINADA POR ISÓTOPOS ESTÁVEIS

1678

1679

1680 Sabrina Medeiros Suita

1681 Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

1682 Cx. Postal 474, CEP: 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

1683 smsuita@yahoo.com.br

1684

1685

1686

1687

1688

1689

1690

1691

1692

1693 Artigo submetido à Revista Aquaculture International (06/05/2015)

1694

1695

1696

1697

1698 **RESUMO**

1699 O objetivo deste trabalho foi utilizar indicadores de qualidade pré-selecionados
1700 para pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* e a técnica de isótopos estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ e
1701 $\delta^{15}\text{N}$, para determinar a influência dos bioflocos entre PL1 e PL30. Um tratamento
1702 Controle (TC), com renovação de água foi comparado a um tratamento Biofoco (TB)
1703 que recebeu fertilizações com carbono orgânico. Na alimentação foram utilizadas
1704 diferentes tipos de ração comercial (Stresspak e Flake-INVE[®], PL40-GUABI[™]),
1705 microalga (*Chaetoceros muelleri*) e náuplius de *Artemia* sp. Parâmetros físicos da água
1706 e amônia foram monitorados diariamente e semanalmente medidas de nitrito, nitrato e
1707 alcalinidade. Houve caracterização de sólidos suspensos e microbiota dos bioflocos. Ao
1708 final do período experimental 15 camarões de cada réplica foram coletados para
1709 avaliação de nove indicadores de qualidade. Assinaturas isotópicas de ^{13}C e ^{15}N das
1710 fontes alimentares e dos tecidos dos camarões foram coletadas nos dias 10, 20 e 30 e um
1711 modelo Bayesiano de misturas isotópicas mensurou contribuições dessas fontes ao
1712 crescimento dos camarões. Os parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos
1713 diferiram estatisticamente quanto à salinidade, nitrito e alcalinidade, porém mantidos
1714 nas concentrações adequadas para o cultivo da espécie. O tratamento TC enquadrou-se
1715 no padrão “Bom”, enquanto o TB como “Excelente” para parâmetros de qualidade de
1716 pós-larvas analisados. O resultado da análise de isótopos estáveis mostra que no
1717 tratamento TC a ração PL40-GUABI[™] se sobrepõe em importância às demais fontes de
1718 alimento ao longo de todo período experimental, já no tratamento TB, para os dias 10 e
1719 20, os bioflocos e as rações (Flake-INVE[®], PL40-GUABI[™]), quando comparados, não
1720 tiveram variações expressivas nas proporções de contribuição, contudo, no dia 30 a
1721 importância da ração PL40-GUABI[™] se sobrepôs expressivamente à dos bioflocos. No
1722 presente estudo foi constatada a capacidade de pós-larvas se beneficiarem

1723 nutricionalmente dos bioflocos e desta forma, o conjunto de resultados obtidos indicam
1724 que pós-larvas de *L. vannamei* cultivadas em meio a bioflocos apresentam melhor
1725 qualidade quando comparadas as cultivadas em água clara.

1726 **Palavras-chave:** Bioflocos, Isótopos estáveis, pós-larvas, qualidade, microrganismos.

1727

1728

1729

1730

1731

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738

1739

1740

1741

1742

1743

1744

1745

1746

1747

1748

1749

Bioflocs contribution to post-larvae

1750

1751 **Contribution of bioflocs to the culture of *Litopenaeus vannamei* post-larvae**
1752 **determined using Stable Isotopes**

1753

1754 Sabrina M. Suita¹, André Braga¹, Eduardo Ballester², Alessandro P. Cardozo¹, Paulo
1755 Cesar Abreu¹, Wilson Wasielesky Jr^{1*}.

1756

1757 ¹Marine Station of Aquaculture

1758 Institute of Oceanography

1759 Federal University of Rio Grande

1760 C.P.474-Rio Grande (RS)-CEP 96201-900- Brazil

1761 ²Federal University of Paraná

1762 Zoology Department

1763 *Corresponding Author

1764 Tel: +5553 3236-8131

1765 Fax:+5553 3236-8042

1766 E-mail: manow@mikrus.com.br

1767

1768

1769 **ABSTRACT**

1770 The aim of this study was to use pre-selected quality indicators for *Litopenaeus*
1771 *vannamei* post-larvae and the stable isotopes technique with $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ to
1772 determine the influence of bioflocs in shrimp feeding during the nursery phase, between
1773 PL1 and PL30. A control treatment (CT) with water renewal was compared to a Biofloc
1774 treatment (BT) that received organic carbon fertilizations. Different types of
1775 commercial feed (Stresspak and Flake-INVE®, PL40-GUABI™), microalgae
1776 (*Chaetoceros muelleri*) and *Artemia* sp. nauplii were used as food sources.
1777 Temperature, salinity, oxygen and ammonia of water were monitored daily, and nitrite,
1778 nitrate and alkalinity were measured weekly. Suspended solids and the microorganisms
1779 of bioflocs were characterized. At the end of the experiment, fifteen shrimps of each
1780 replicate were collected to evaluate nine larvae quality indicators. Isotopic values of ^{13}C
1781 and ^{15}N of food sources and shrimp tissues were collected on days 10, 20 and 30, and a
1782 Bayesian model of isotopic mixture measured the contributions of these sources to the
1783 shrimp biomass. Salinity, alkalinity and nitrite differed significantly between the
1784 treatments but were appropriate for post-larvae production. The larvae quality
1785 conditions in the CT treatment were ranked as "Good" whereas the BT conditions were
1786 considered "Excellent" according to the analysis of larval quality parameters. The stable
1787 isotopes analysis showed that the PL40 GUABI™ feed was the most important food
1788 source throughout the experimental period in the CT. In the BT (10th and 20th days), the
1789 bioflocs and commercial feeds (Flake-INVE®, PL40-GUABI™) did not present
1790 significant variations in their contribution ratios; however, on the 30th day, the
1791 contribution of the PL40-GUABI™ feed was higher when compared to bioflocs. In
1792 general, the commercial feed played a more important role as a food source for

1793 *Litopenaeus vannamei* larvae during the nursery phase, although the consumption of
1794 bioflocs led to a better larvae quality

1795 Key-words: Biofloc, stable isotopes, nursery, shrimp, post-larvae quality.

1796 **INTRODUCTION**

1797 In the early stages of marine shrimp culture, a diet with live food, such as
1798 *Artemia* sp. Nauplii, is important for the successful development of the species
1799 (Gamboa-Delgado and Le Vay 2009). The live food sources can be more efficient
1800 because they remain viable for a longer time in the water column, present high
1801 digestibility and may also be enriched with other nutrients of interest for the raised
1802 organisms (Southgate and Partridge 1998). However, live food is expensive and
1803 depends on specialized workers for their production. Thus, there is an effort to increase
1804 the assimilation of inert feed to levels close to the live food and to develop strategies to
1805 keep the live food available for longer periods in the production system.

1806 The use of Biofloc Technology system in the grow-out phase of marine shrimp
1807 production reduces the need for water exchange. This technology is based on the
1808 addition of an organic carbon source that is used by bacteria to convert the excess of
1809 nitrogen in the microbial biomass in the production tanks (Avnimelech 1999). The use
1810 of bioflocs during the shrimp grow-out phase allows an increase in the stocking density
1811 (Krummenauer et al. 2011) and maintains water quality parameters at safe levels due to
1812 the presence of bacteria that remove potentially toxic nitrogen compounds for shrimps
1813 (Avnimelech 1999; Avnimelech and Kochba 2009). Furthermore, the microbial
1814 community present in bioflocs is also used as an additional food source for the raised
1815 organisms (Burford et al. 2004; Wasielesky et al. 2006; Avnimelech 2007; Samocha et
1816 al. 2007).

1817 In aquaculture, the marine shrimp production from the PL1 phase (one day after
1818 completing the mysis III phase) until PL30 can be termed as hatchery or nursery. In
1819 general, the shrimp production in these stages is performed in clear water with higher
1820 water renewal rates. Studies of *Farfantepenaeus paulensis* in the nursery phase using
1821 biofilm showed that juveniles of marine shrimp can use microorganisms present in the
1822 biofilm as a supplementary food source (Abreu et al. 2007). Lopes et al. (2012) worked
1823 with *Farfantepenaeus brasiliensis* in the nursery phase and concluded that the presence
1824 of bioflocs in the tanks led to the increase in the stocking density of this species. Suita et
1825 al. (2015a) showed that *L. vannamei* post-larvae (PL1-PL30 phases) reared in a biofloc
1826 system presented excellent quality indicators, such as intestinal peristalsis and
1827 abdominal opacity.

1828 During the early post-larval stage (PL1-PL30), it is difficult to evaluate the
1829 quality of the shrimp based solely on weight gain and survival. Therefore, a quality
1830 evaluation of post-larvae reared in the laboratory is performed using a series of
1831 macroscopic and microscopic criteria that may indicate the quality of the production of
1832 a particular batch. These evaluations are called presumptive analysis or analysis quality,
1833 and when combined, they may indicate the physiological status of the shrimp (FAO
1834 2004).

1835 Although *L. vannamei* is currently the most widely produced species of marine
1836 shrimp in the world (FAO 2012), studies that define how this species can take
1837 advantage of the natural food present in bioflocs and use them for their growth are rare,
1838 especially for the early life stages (PL1 until PL30).

1839 A post-larvae gut content analysis can be performed to check food intake.
1840 However, it is difficult to identify the ingested microorganisms using this method
1841 because they are triturated during the passage through the digestive tract, and the post-

1842 larvae are small. In addition, the result of this analysis reflects what was ingested by the
1843 animal moments before being collected and not necessarily what was assimilated and
1844 used for their growth (Schwamborn and Criaes 2000).

1845 The stable isotope technique has been used as a complement to conventional
1846 techniques used in diet studies, showing the proportion of each prey/feed as assimilated
1847 into the predator's diet. This technique can also be used to mark microbial aggregates
1848 and to verify the intake of specific prey (Burford et al. 2002). Therefore, this technique,
1849 associated with mathematical models, can be used as a tool to identify which food
1850 source is the major contributor to the growth of a species (Philips and Gregg 2001). The
1851 principle of this technique is that stable isotopes of different chemical elements in the
1852 animal tissue reflect the ratio present in the food consumed and is registered as a
1853 signature in the new formed tissues (Peterson and Fry 1987).

1854 Therefore, the aim of this study was to evaluate the contribution of bioflocs, live
1855 food and different feed types on the performance and quality of *L. vannamei* post-larvae
1856 in the PL1 to PL30 phases.

1857 **MATERIAL AND METHODS**

1858 ***Biological material***

1859 *L. vannamei* nauplii were acquired from Aquatec Laboratory (Rio Grande do
1860 Norte, Brazil) and transported to the Marine Aquaculture Station of the Federal
1861 University of Rio Grande (Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil), where they were
1862 reared until they reached the post-larvae stage. The experiment lasted for 30 days,
1863 starting in PL1 (post-larvae of 1 day) and ending when larvae reached PL30.

1864 ***Experimental design***

1865 The experimental units used were PVC tanks with a "U" shape, with a volume of
1866 15 liters each. The initial stocking density was 83 shrimp L⁻¹. Two treatments with four
1867 replicates each were performed. The Control Treatment (CT) used clear water, and
1868 when the ammonia concentration reached 0.5 mg L⁻¹, approximately 70% of the water
1869 was renewed. In the Biofloc Treatment (BT), organic fertilization with dextrose was
1870 used to control the ammonia levels (added every time the total ammonia was higher
1871 than 0.5 mg L⁻¹). In this treatment, no water renewal was performed. The organic
1872 fertilization in BT followed the methodology described by Ebeling et al. (2006). The
1873 ammonia concentration used as the limit (0.5 mg L⁻¹) was below the safe level
1874 recommended for *L. vannamei* post-larvae (Cobo et al. 2012).

1875 Shrimps were fed four times a day in both of the treatments from PL1 to PL10.
1876 The commercial feeds Flake and StressPak (INVE®) were offered two times a day, as
1877 well as frozen *Artemia* sp. nauplii. From PL10 to PL20, the animals were fed five times
1878 a day, two times with Flake-INVE® and two times with the commercial nursery feed
1879 PL40-GUABI™, whereas frozen *Artemia* sp. nauplii was offered once a day. After
1880 PL20, the feed PL40-GUABI™ was offered four times a day, and frozen *Artemia* sp.
1881 nauplii was offered once a day. The microalgae *Chaetoceros muelleri* was inoculated
1882 into the experimental tanks in the first experimental day at a concentration of 5 x 10⁴
1883 cells mL⁻¹. Daily counts were performed to maintain this initial concentration. The
1884 feeding regime was adapted from FAO (2004). A daily application of a probiotic (Pro-
1885 W INVE®) (1.0 ppm) was also performed.

1886 ***Water treatment and Physical - Chemical Parameters***

1887 In this experiment, filtered seawater (sequence of filters 25 µm, 5 µm and 1
1888 µm)(salinity 30) was used and was chlorinated with sodium hypochlorite (15 ppm) and
1889 dechlorinated with ascorbic acid (1 ppm). EDTA (20 ppm) was used to avoid the

1890 presence of heavy metals. Thermostat heaters were used in a water table that contained
1891 the experimental tanks to keep the temperature in the tanks at approximately $29\pm 1^\circ\text{C}$.
1892 The salinity was adjusted daily and kept close to 30 with the addition of fresh water
1893 from the local supply company. The fresh water was previously filtered, treated (as
1894 seawater) and heated. Aeration was supplied through porous stones.

1895 Daily measurements of dissolved oxygen (Oxymeter YSI55, Yellow Springs,
1896 OH, USA), temperature (mercury thermometer) and pH (YSI 100 pH-meter, Yellow
1897 Springs, OH, USA) were performed. Ammonia (N- ($\text{NH}_3^- + \text{NH}_4^+$)) was analyzed every
1898 two days (UNESCO 1983). Nitrite (N- NO_2^-) (Bendschneider and Robinson 1952) and
1899 phosphate (P- PO_4^{3-}) (Aminot and Chaussepied 1983) were measured weekly. Alkalinity
1900 ($\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$) (APHA 1958) and nitrate (N- NO_3^-) were determined in the initial and
1901 final samples (Aminot and Chaussepied 1983).

1902 *Characterization of Bioflocs*

1903 The bioflocs were characterized by the measurements of suspended solids
1904 (AOAC 2000). The quantification and characterization of the microbial community
1905 present in the bioflocs was determined using an inverted microscope. In the same
1906 analysis, the microorganisms present in the water were observed. For this analysis,
1907 water samples were collected from each tank, fixed in 4.0% formalin and kept in amber
1908 vials for further counting and identification of microorganisms groups. The groups of
1909 microorganisms and microalgae were identified and quantified using an inverted
1910 microscope (Zeiss Axiovert) with a final magnification of 400x, following the technique
1911 of Utermöhl (1958).

1912 *Post-larvae quality analysis*

1913 Every day, samples of five post-larvae from each unit were taken for
1914 microscopic observations and the analysis of gill development and were then discharged

1915 after the analysis. At the end of the experiment, ten shrimps of each unit were submitted
1916 to stress tests for temperature (FAO 2004) and salinity (Samocha et al. 1998), and
1917 fifteen shrimps from each tank were used for the post-larvae quality analysis. At the end
1918 of the experimental period, survival (%), weight (g) and length (mm) of post-larvae (n =
1919 20) were recorded.

1920 The quality analysis of the post-larvae followed a methodology adapted from
1921 Lopes et al. (2012) and Suita et al. (2015a). Fifteen shrimp from each tank were
1922 observed, taking into account the abdominal color (opaque or translucent),
1923 hepatopancreas color (dark, pale or transparent), intestinal peristalsis (absent, reduced or
1924 intense), ratio of muscle: gut, body melanization, fouling by epibionts, hepatopancreas
1925 filling, necrosis and deformities in the hepatopancreas tubules and appendices necrosis.

1926 Each evaluated parameter was given a score between 0 and 2 points (0 = poor, 1
1927 = good, 2 = excellent). Each evaluated post-larvae was scored using the sum of this
1928 score. The post-larvae with scores higher than 16 were considered of excellent quality.
1929 Those with a score between 7 and 15 were of good quality, and those below 6 were of
1930 poor quality.

1931 *Stable Isotopes analysis*

1932 Samples of different food sources, bioflocs and shrimp post-larvae were
1933 collected on the 10th, 20th and 30th days of the experiment to determine the carbon and
1934 nitrogen isotopic values. To collect the bioflocs, one liter of water was transferred from
1935 the tanks with beakers, and after 30 minutes, the settled material was collected and
1936 stored in Eppendorf vials. Samples were kept in an ultra freezer (Quimis 80v) and
1937 lyophilized in Freeze (Liotop-L101/ Liobras®) for approximately 10 hours at the
1938 Laboratory of Marine Birds and Turtles of the Institute of Biological Sciences, FURG.

1939 All of the samples were ground, weighed (1.0 ± 0.2 mg) and placed into tin
1940 capsules. The analyses of carbon ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$) isotopic ratios were
1941 performed at the UC Davis Stable Isotope Facility, CA. The results of the analyses were
1942 quantified according to the delta notation:

$$1943 \quad \delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

1944 Where R_{sample} is the ratio of heavy and light isotopes from the sample and
1945 R_{standard} corresponds to the ratio between heavy and light isotopes of Pee Dee belemnite
1946 and atmospheric air, the international standards for carbon and nitrogen, respectively.
1947 The Bayesian model of isotopic mixtures (package SIAR; Parnell et al. 2010) was used
1948 to obtain the relative contributions of food sources to the growth of shrimp in different
1949 culture periods. The probiotic was analyzed, and the value was -24.99 to ^{13}C and 1.35 to
1950 ^{15}N .

1951 The assumed fractionation was set at 0.4 ‰ for $\Delta^{13}\text{C}$ and 2.7 ‰ $\Delta^{15}\text{N}$, values
1952 previously used for *L. vannamei* post-larvae by Dittel et al. (1997). The limits of
1953 fractionation of 1 ‰ to $\Delta^{13}\text{C}$ and 3 ‰ to 4 ‰ $\Delta^{15}\text{N}$ were also tested for comparison
1954 purposes, as suggested by Peterson and Fry (1987) for marine and estuarine organisms.
1955 Fractionations of 0.5 ‰ to $\Delta^{13}\text{C}$ and 2.5 ‰ $\Delta^{15}\text{N}$ were also used, as suggested by
1956 Vanderklift and Ponsard (2003) for aquatic organisms and according to Caut et al.
1957 (2009) for marine invertebrates.

1958 ***Statistical Analysis***

1959 Differences in growth of shrimp in the two treatments were evaluated by testing
1960 “t” ($\alpha = 0.05$) after the assumptions of homoscedasticity and normal distribution of the
1961 data were verified. Before applying the test, survival data were transformed to arcsine
1962 square root. The contribution of each food source for *L. vannamei* was determined
1963 through the isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the estimated diet, using mixing models

1964 with a Bayesian approach in R software, with the package SIAR (Parnell et al. 2010).
1965 Three isotopic mixture models for each treatment (10th, 20th and 30th days) were
1966 established to infer the contribution from different sources in the diet. Models were used
1967 in six potential food items, five in CT (*Artemia* sp., *C. muelleri*, Stresspak and Flake-
1968 ®INVE and PL40-GUABITM) and six in BT (*Artemia* sp., *C. muelleri*, Stresspak and
1969 Flake- ®INVE, PL40-GUABITM and bioflocs). The credibility interval (CI) used was
1970 95%.

1971 **RESULTS**

1972 ***Water quality***

1973 The mean water quality parameters only presented significant differences (p
1974 <0.05) for the salinity and nitrite values, with higher values in BT. In the CT, alkalinity
1975 was statistically higher. The mean values of the water quality parameters are shown in
1976 Table 1. As expected, the concentration of suspended solids was higher (p <0.05) in BT
1977 throughout the experimental period (Figure 1).

1978 Table 1. Values (mean ± SD) of physicochemical variables of water quality of post-
1979 larvae of the Pacific white shrimp *L. vannamei*, where CT= Control treatment and BT=
1980 Biofloc treatment.

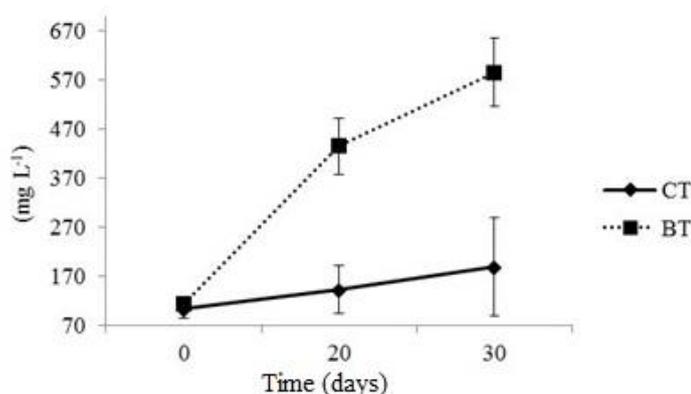
1981

Treatments	CT	BT
Temperature (°C)	27.8±1.14	28.13±1.33
Oxygen (mg L ⁻¹)	5.72±0.4	5.73±0.49
pH	8.05±0.24	8.04±0.23
Salinity	30.16±0.98 ^a	31.33±0.52 ^b
Alcalinity (mg L ⁻¹ as CaCO ₃)	248.75±2.5 ^a	112.5±14.43 ^b
Phosphate (mg L ⁻¹)	0.99±0.6	1.93±1.21
Ammonia (mg L ⁻¹)	0.65±0.15	0.65±0.1
Nitrite (mg L ⁻¹)	0.7±0.15 ^a	1.34±0.3 ^b
Nitrate (mg L ⁻¹)	1.32±1.17	1.9±2

1982

1983

*Different letters in the same row mean significant difference between treatments



1984

1985

Figure 1. Values (mean ± SD) of suspended solids (mg L⁻¹) in the production of

1986

Pacific white shrimp *L. vannamei* using the CT and BT.

1987

Post-larvae growth performance and quality

1988

The daily microscopic observations did not present significant differences

1989

between the treatments for the development time of the gills, as full development

1990

occurred in 16.33 ± 1.52 days for CT and 16.33 ± 0.53 days for BT. The animals

1991

submitted to the stress test in both of the treatments presented a 100% survival rate. No

1992

differences were observed in the growth performance or the survival of the post-larvae

1993

in both of the treatments. The final post-larvae quality evaluation recorded a higher

1994

score in BT, resulting in a final evaluation score of Excellent (Table 2).

1995 Table 2. Values (mean \pm SD) of performance parameters and quality of post-larvae of
 1996 the Pacific white shrimp *L. vannamei* in the CT and BT.

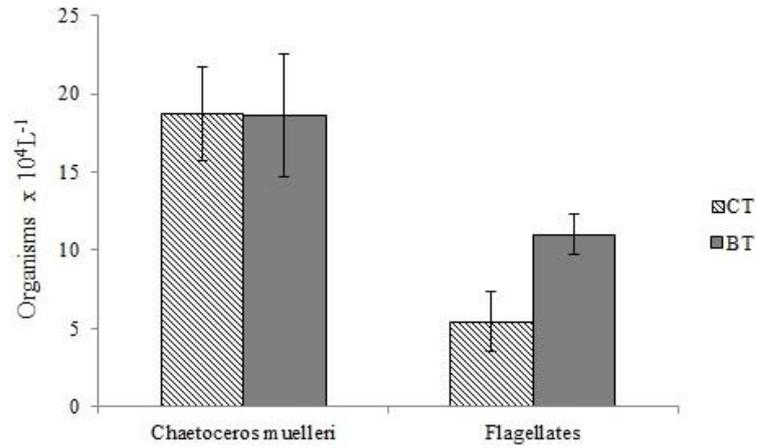
Treatments	CT	BT
<i>Post-larvae quality</i>		
Color of the abdomen	1.9 \pm 0.11	2 \pm 0
Color of the hepatopancreas	2 \pm 0	2 \pm 0
Intestinal peristalsis	2 \pm 0	2 \pm 0
Proprtion muscle:gut	2 \pm 0	2 \pm 0
Melanization in the body	1.8 \pm 0.05 ^a	1.93 \pm 0.12 ^b
Necrosis	1.9 \pm 0.11	1.93 \pm 0.12
Deformities in the hepatopancreas	1.43 \pm 0.32	1.57 \pm 0.32
Fill the hepatopancreas	1 \pm 0	1.33 \pm 0.23
Epibiont fouling	1.17 \pm 0.29	1.3 \pm 0.17
Final score	15.2 \pm 0.26	16.06 \pm 0.58
Final evaluation	Good	Excellent
<i>Performance</i>		
Survival (%)	93.2 \pm 7.11	91.2 \pm 8.53
Initial weight (mg)	0.65 \pm 0.2	0.65 \pm 0.2
Final weight (mg)	35 \pm 10	36 \pm 16
Initial length (mm)	5.75 \pm 2.59	5.75 \pm 2.59
Final length (mm)	16.81 \pm 1.82	16.39 \pm 2.54
Final biomass (g)	3.16 \pm 0.7	3.14 \pm 0.44

1997

1998 *Different letters in the same row mean significant difference between treatments

1999 ***Microbial community***

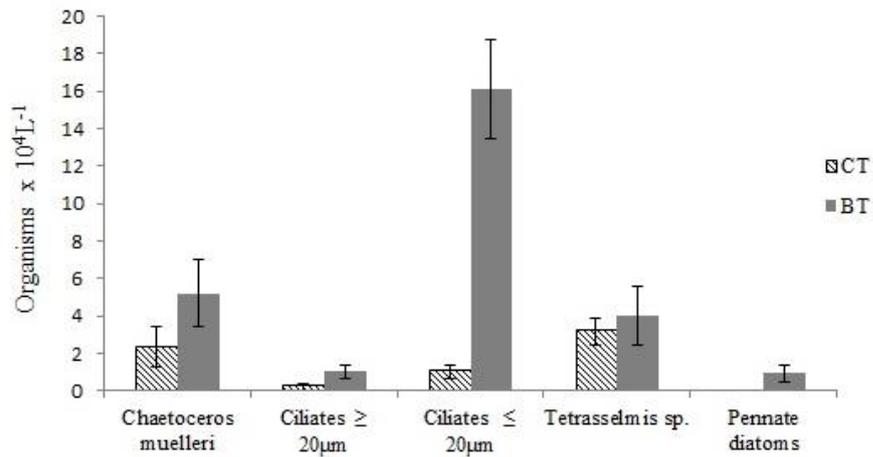
2000 In both of the treatments, the presence of flagellates was recorded only on the
 2001 10th day (Figure 2). In the BT, the bioflocs contained pennate diatoms, as well as a
 2002 higher density of small ciliates (\leq 20 μ m) than the CT (Figure 3). At the end of the
 2003 experiment, the microbial colonization differed between the treatments by the absence
 2004 of large ciliates (\geq 20 μ m) in the CT, in addition to a greater abundance of small ciliates
 2005 (\leq 20 μ m) and microalgae (i.e., *Tetraselmis* sp.) in the BT. Moreover, the presence of
 2006 *Planktonema* sp. colonies in the CT and rotifers in the BT was recorded (Figure 4).



2007

2008 Figure 2. Mean values (\pm SD) of the microbial community in the Pacific white shrimp

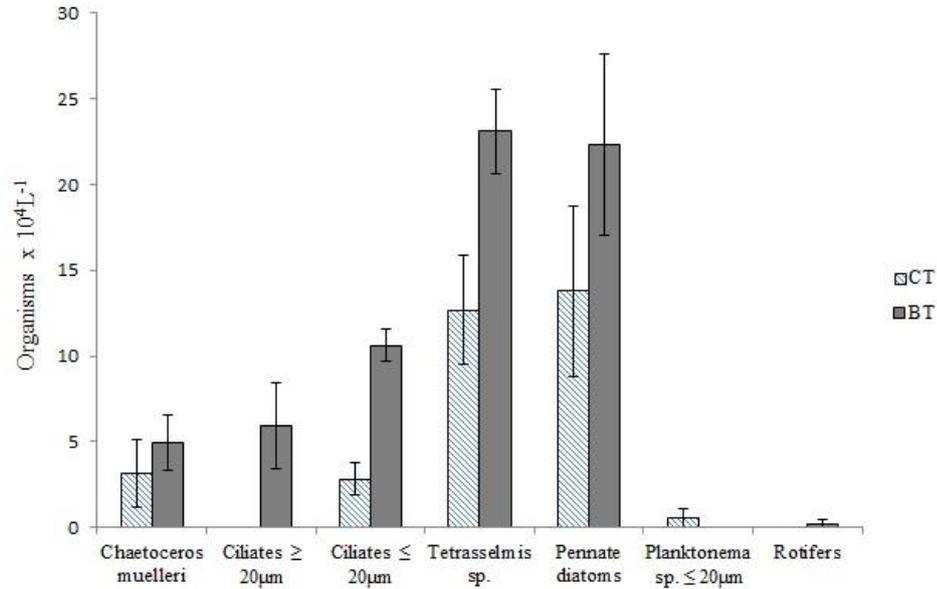
2009 *L. vannamei* post-larvae farming in the CT and BT on the 10th day.



2010

2011 Figure 3. Mean values (\pm SD) of the microbial community in the Pacific white shrimp

2012 *L. vannamei* post-larvae farming in the CT and BT on the 20th day.



2013

2014 Figure 4. Mean values (\pm SD) of the microbial community in the Pacific white
 2015 shrimp *L. vannamei* post-larvae farming in the CT and BT on the 30th day.

2016 ***Stable isotopes***

2017 Figure 5 shows the isotopic values $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the food sources and post-
 2018 larvae for the CT and BT at different times (10th, 20th and 30th days). The contribution
 2019 credibility intervals of the food sources in the CT and BT on the 10th, 20th and 30th days
 2020 are shown in Figures 6 and 7 (a, b and c), respectively. Table 3 shows the percentage
 2021 variation of the contribution of each food source in the post-larvae growth over time.

2022 Table 3. Contribution interval (CI) of different food sources during Pacific white shrimp
 2023 *L. vannamei* farming in a bioflocs system.

Days/Sources	<i>Artemia</i> sp.	<i>C. muelleri</i>	Flake	Stresspak	PL40	Bioflocs
Control Treatment						
10 th	0-34%	0-68%	0-61%	6-50%	N.A.	N.A.
20 th	0-24%	0-51%	0-35%	N.A.	16-81%	N.A.
30 th	0-20%	12-50%	N.A.	N.A.	40-71%	N.A.
Biofloc Treatment						
10 th	0-30%	0-44%	0-51%	0-45%	N.A.	0-47%
20 th	0-18%	0-33%	0-34%	N.A.	8-59%	0-54%
30 th	0-23%	0-45%	N.A.	N.A.	13-68%	0-50%

2024

2025 *N.A. Not added as a food source

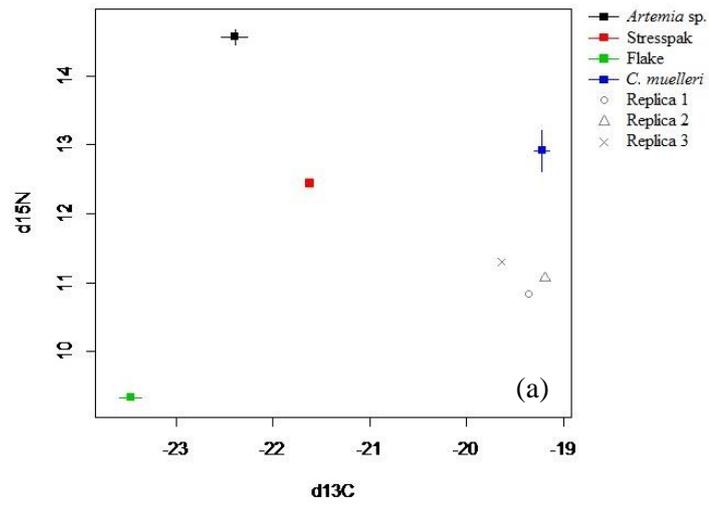
2026 The isotopic values found in the post-larvae showed that the importance of
2027 *Artemia* sp. and Flake-INVE® feed decreased over time in both of the treatments;
2028 however, the PL40-GUABI™ feed tended to increase their contribution to the animals
2029 in both of the treatments.

2030 The Stresspak-INVE® feed provided on the 10th day contributed similarly in
2031 both treatments, CI = 6-50% for CT and CI = 0-45% for BT. The same pattern was
2032 observed for the microalgae (*C. muelleri*), which varied from 0-68% (CI) on day 10 and
2033 varied from 12- 50% (CI) on the 30th day in the CT. In the BT, there was a little change
2034 in this microalgae contribution over time, CI = 0- 44% on day 10 and CI = 0-45% on
2035 day 30. The same pattern was observed in biofloc contributions (TB) with CI = 0- 47%
2036 on day 10 and CI = 0- 50% on day 30.

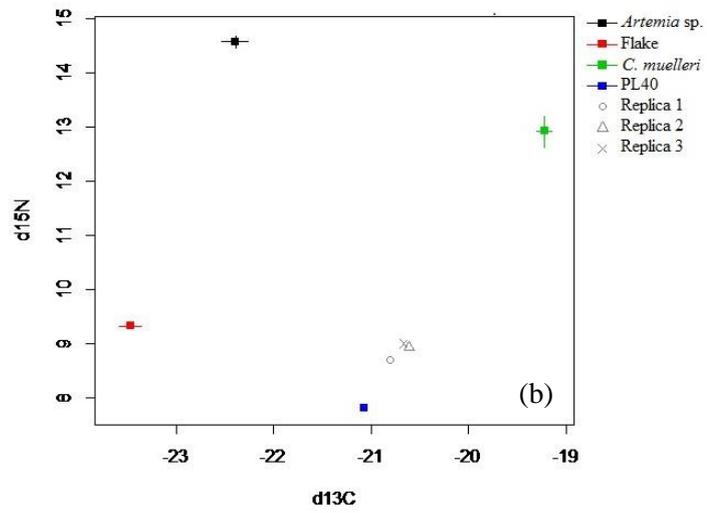
2037 The data for the CT on 10th day were not adequate for the fractionation used in
2038 this study, as well as for any fractionation tested in sensitivity tests. The post-larvae
2039 isotopic signature was outside the polygon formed by all of the food sources, as shown
2040 in Figure 5 (a).

2041 The sensitivity of *Artemia* sp. to the model in relation to its CI was observed by
2042 the fractioning tests. By changing the fractioning to 1‰ $\Delta^{13}\text{C}$ and 4‰ $\Delta^{15}\text{N}$ and 3‰ Δ
2043 ^{15}N , in BT (30th day), the CI of *Artemia* sp. overlapped the bioflocs and microalgae. In
2044 the CT (20th day), varying the fractioning to 1‰ $\Delta^{13}\text{C}$ and 4‰ $\Delta^{15}\text{N}$ showed that
2045 *Artemia* sp. increased its CI, with a contribution similar to the microalgae and Flake-
2046 INVE® feed. For all of the other days in both treatments, independent of the used
2047 fractionation, the CI of each source varied at the same proportions, keeping the
2048 importance of the food sources at the same pattern.

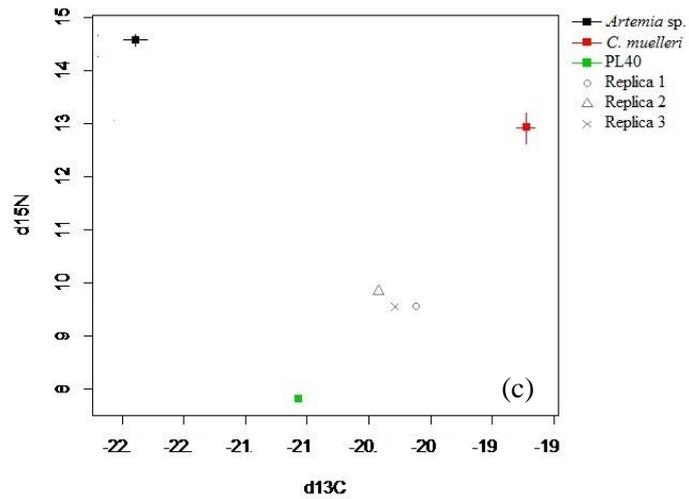
2049
2050



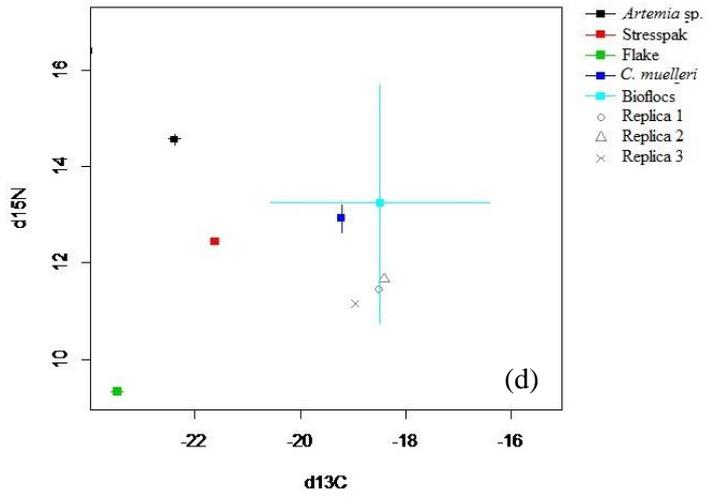
2051



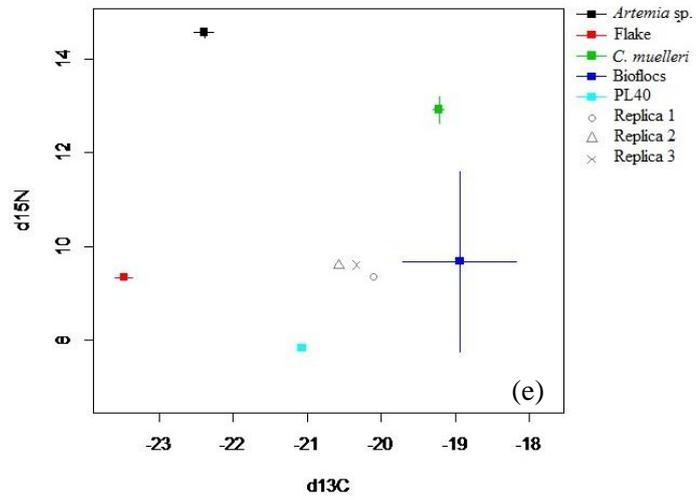
2052



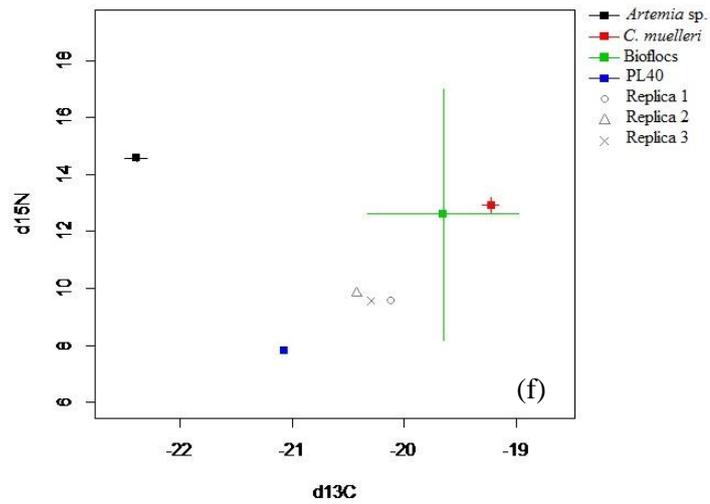
2053



2054



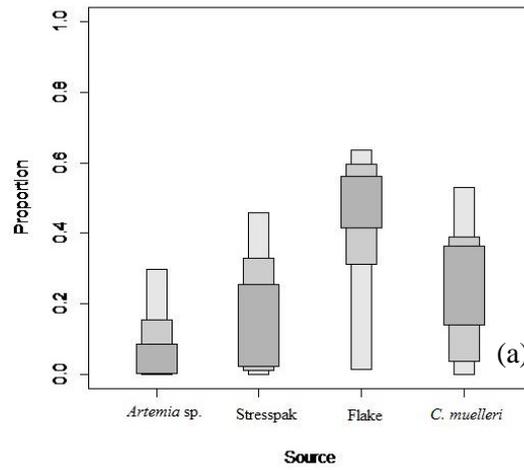
2055



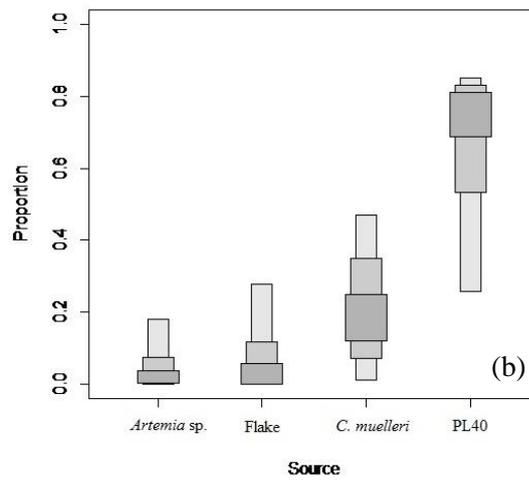
2056

2057

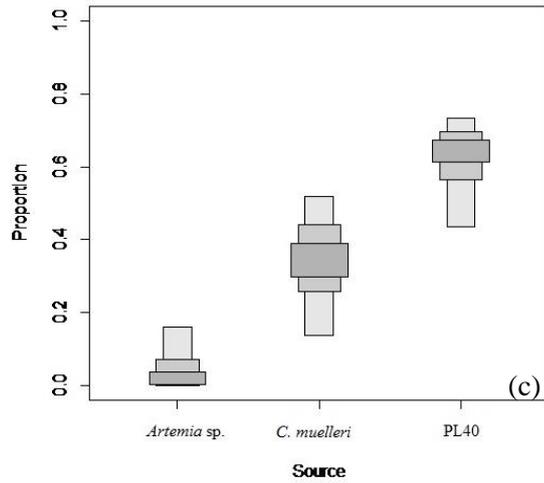
2058 Figure 5. Distribution of isotopic values for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, the different sources of
 2059 artificial food, *Artemia* sp., *C. muelleri* and bioflocs. Replicas 1, 2 and 3 are the
 2060 signatures of shrimps for the CT on the 10th (a), 20th (b) and 30th (c) days and for the BT
 2061 on the 10th (d) 20th (e) and 30th (f) days.



2062

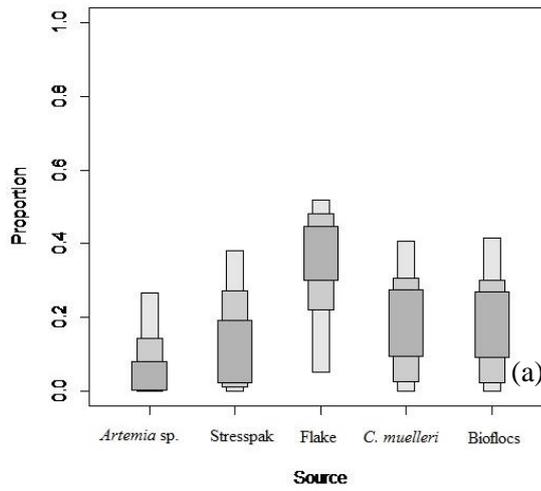


2063

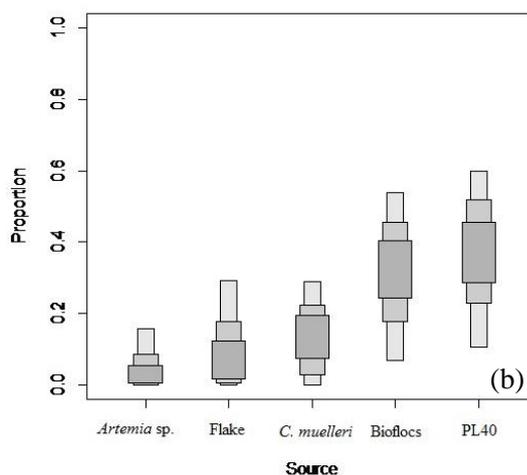


2064

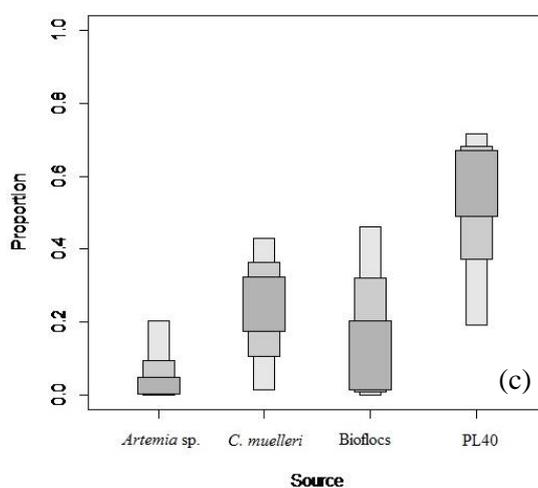
2065 Figure 6. Average values (proportion x 100%) of the contribution of different food
 2066 sources provided in the Pacific white shrimp *L. vannamei* post-larvae farming in the CT
 2067 (Control Treatment) on the 10th (a), 20th (b) and 30th (c) days .



2068



2069



2070

2071 Figure 7. Average values (proportion x 100%) of the contribution of different food
 2072 sources provided in the Pacific white shrimp *L. vannamei* post-larvae farming in the BT
 2073 (Control Treatment) on the 10th (a), 20th (b) and 30th (c) days .

2074 **DISCUSSION**

2075 The analysis of the post-larvae quality can be performed by considering a set of
 2076 parameters, which together can denote the quality of the produced animals (Suita et al.
 2077 2015a). In the present study, it was observed that the feed offered in the BT associated
 2078 with the presence of bioflocs showed higher scores in the quality items assessed,
 2079 generating a better quality post-larvae than the CT. Although the CT did not differ
 2080 statistically from the BT, it received an inferior final score for post-larvae quality.

2081 Despite this difference, the survival in both treatments was higher, above 90%, without a
2082 distinction between the treatments.

2083 During the hatchery and nursery phases, the phytoplankton community provides
2084 important nutrients for shrimp growth because they are rich sources of essential
2085 nutrients that are important to the growth and successful development of penaeid
2086 shrimps (Ballester et al. 2003; Silva et al. 2008.). Under the appropriate conditions of
2087 light incidence, phytoplankton is the first to grow and provide a basic food source for
2088 the further development of zooplankton and bacteria (Tacon et al. 2002). However, Ray
2089 et al. (2010) noted it was difficult to maintain a microalgae community culture in
2090 biofloc systems because the increase in suspended solids tended to decrease light
2091 penetration, leading to a collapse in the phytoplankton community. Therefore, the
2092 addition of dextrose to biofloc systems as a carbon source proved to be an appropriate
2093 carbon source because it maintained the water transparency and allowed the presence of
2094 a microalgae community in the culture tanks (Suita et al. 2015b).

2095 For the microalgae used in this study, *C. muelleri*, Jaime-Ceballos et al. (2006)
2096 reported that the digestibility of this microalgae by *L. vannamei* could reach up to 94 %.
2097 Moreover, Godoy et al. (2012) observed that the presence of diatoms in the culture
2098 environment contributed to a better performance of *L. vannamei* in the nursery phase.
2099 However, the increase of suspended solids in the water column may hinder the presence
2100 of these organisms in the culture environment. The BT in the present study, although
2101 developed with the presence of bioflocs, enabled the presence of a microalgae
2102 community throughout the experimental period at a higher density than the CT, even
2103 when the addition of *C. muelleri* ceased after the 10th day. This may have positively
2104 affected the larval quality results.

2105 The stable isotope technique can be used to understand the energy flows in food
2106 webs, and carbon and nitrogen isotopes are commonly used to elucidate the trophic
2107 structure, energy interference and flow of matter. The technique can be used in all size
2108 classes, from bacteria to whales (Middelburg 2014). Generally, $\delta^{13}\text{C}$ data show the
2109 primary energy source, while $\delta^{15}\text{N}$ data show the trophic level in which the animal is
2110 inserted (Peterson and Fry 1987). The use of mixture models in the data analysis
2111 converted the isotopic data of the different food sources into contribution estimates of
2112 each food source for the growth of the studied species. However, this technique is an
2113 auxiliary tool and should be used in addition to the analysis of other criteria (Philips et
2114 al. 2014).

2115 Isotope analysis shows how the isotopic profile of a diet is incorporated into the
2116 animal tissue, causing what is called isotopic equilibrium. This process is species-
2117 specific and related to the ontogeny and metabolic rate of each species (Pearson et al.
2118 2003). Previous studies estimated that in young shrimp, 15 days is the time required to
2119 achieve a balance between the body and the diet (Gamboa-Delgado and Le Vay 2009;
2120 Gamboa-Delgado et al. 2013) or the time when the animal body quadruples their weight
2121 (Fry and Arnold 1987), and so the results are reliable. In this study, at the end of the
2122 experimental period, there was a weight increase of approximately 5,000 % when
2123 compared to the initial weight, which maintained the hypothesis of equilibrium between
2124 post-larvae and diets.

2125 However, samples collected on the 10th day may not have been viable because
2126 shrimp had not yet acquired equilibrium with all of the food offered in the diet,
2127 especially in the CT. Nevertheless, at this day, it was likely that the shrimp bodies were
2128 already in balance with the signatures of microalgae and *Artemia* sp. because these
2129 foods were previously provided in the experiment. However, these results were for the

2130 bioflocs and commercial feed on 10th day, and the collected data were considered more
2131 consistent for days 20 and 30.

2132 When applying a mathematical model to a stable isotope analysis, a given factor,
2133 such as enrichment or isotopic fractionation, must be considered. This occurs by the
2134 accumulation of the heavier isotopes of atoms in the tissue of a consumer and the
2135 measurement of this atom transfer into the food chain (Fry 2006). However, these
2136 factors may be subjective, as they may vary with the species, studied tissue, the offered
2137 diets (Gamboa-Delgado and Le Vay 2009; Post 2002) and the ontogeny of the each
2138 species (Rossi et al. 2004).

2139 There is a consensus that this fractionation for aquatic animals is approximately
2140 0-1 ‰ $\Delta^{13}\text{C}$ and up to 4 ‰ to $\Delta^{15}\text{N}$ (Peterson and Fry 1987). However, these values
2141 are often unknown, making it difficult to obtain objective conclusions because most
2142 studies are based on bibliographic data (Gamboa-Delgado et al. 2013).

2143 Due to a lack of studies with stable isotopes for the post-larvae life stage of *L.*
2144 *vannamei*, comparative tests were conducted with different fractionations. Changes in
2145 the isotopic discrimination factors may lead to erroneous conclusions (McCutchan et al.
2146 2003). However, in this work, except for the CI of *Artemia* sp., there were no significant
2147 changes in the results, which provided credibility to our results.

2148 The present study used the fractionation applied by Dittel et al. (1997), as it was
2149 used for whole body analysis of *L. vannamei* post-larvae. The results showed that as the
2150 post-larvae grew, the importance of artificial feed increased, in this case PL40-GUABI
2151 TM). Similar results were also reported for the gut content analysis of *F. paulensis* by
2152 Soares et al. (2005). Data from Gamboa-Delgado and Le Vay (2009) corroborated these
2153 results, showing that the incorporation of artificial feed in the tissues of *L. vannamei*
2154 post-larvae increased as they grew.

2155 During the trial period, the contribution of *Artemia* sp. decreased in similar
2156 proportions in both treatments, but this food source could still provide nutrients needed
2157 for the proper development of early life stages of penaeid shrimps, in addition to its
2158 higher digestibility and stability in the water column than the inert food (Gamboa-
2159 Delgado and Le Vay 2009). These same authors produced *L. vannamei* between Mysis
2160 III to PL5 in clear water and showed that the use of *Artemia* sp. could provide
2161 approximately 73-87% of the necessary carbon for the species development. The same
2162 study also showed that larvae fed with only artificial diets reached the PL1 stage 3-4
2163 days later when compared to those co-fed with *Artemia* sp.

2164 Nevertheless, for the production of live prey, such as *Artemia* sp., skilled labor is
2165 required, which generates an increase in production costs. In addition, these organisms
2166 can be important disease vectors because their cysts can carry bacteria and fungi
2167 (Naylor et al. 2009). The present study found that *Artemia* sp. showed a smaller
2168 contribution than other food sources for the growth of post-larvae. Therefore, it may be
2169 advantageous to reduce its use although it is unknown what proportions or what direct
2170 effect the reduction of its use could cause in post-larvae.

2171 Although the CI of different feeds was more significant over time, the CI of the
2172 microalgae in both treatments and bioflocs in BT were relevant to the last trial day.
2173 Previous studies cited the importance of microalgae for penaeid shrimp because they are
2174 an excellent source of protein (Silva et al. 2008) and an important carbon source for *L.*
2175 *vannamei* post-larvae (Dittel et al. 1997). Ballester et al. (2003) also reported that the
2176 consumption of microalgae present in the biofilm can significantly contribute to the
2177 growth of *F. paulensis*. It is known that bioflocs can contribute up to 29% to shrimp
2178 growth in adults of *L. vannamei* (Burford et al. 2004).

2179 A stomach contents analysis of the same species indicated that the natural
2180 microbiota can serve as a complementary feeding source (Thompson et al. 2002). The
2181 post-larvae were selective to prey on microbial aggregates (Dittel et al. 1997), which
2182 likely occurred in this study when the post-larvae preyed on specific microorganisms in
2183 the bioflocs. The increase in the abundance of ciliates over time in the BT and the
2184 rotifers presence can also be related to the better quality of post-larvae. These
2185 microorganisms are consumed by *L. vannamei* larvae, and as it is preyed upon, it can
2186 serve as a "link" between bacteria and shrimps (Nagano and Decamp 2004).

2187 In the BT, the bioflocs showed similar isotopic values at the 10th and 30th days,
2188 which may be due to the incorporation of microalgae to the bioflocs because the
2189 bioflocs were microbial aggregates associated with organic and inorganic matter present
2190 in the culture medium (Avnimelech 1999) or due the grazing by the microorganisms
2191 bioflocs upon the microalgae. Thus, there was difficulty distinguishing the real
2192 contribution of bioflocs for the growth of post-larvae when compared to microalgae CI.

2193 The bioflocs appeared to have an important role in the performance and quality
2194 of *L. vannamei* post-larvae. This fact may be more important than its contribution as a
2195 food source when compared with the commercial feed, however, when considering the
2196 post-larvae quality parameters and growth performance obtained in this study and
2197 comparing such results with previous studies on production of *L. vannamei* of the same
2198 age in biofloc systems, which have better quality and nutritional status than post-larvae
2199 produced in clear water (Suita et al. 2015a).

2200 The stable isotope technique contributed to assessing how the presence of
2201 bioflocs can contribute to the feeding and performance of *L. vannamei* post-larvae.
2202 However, to provide more confidence in the data, the specific fractionation for this
2203 species at this life stage in this feeding regime must be determined. Moreover, the use of

2204 specific markers for possible prey present in bioflocs or microalgae should be
2205 considered in order to know the selectivity of shrimp at this life stage when using
2206 microorganisms from bioflocs as a food source.

2207 **CONCLUSIONS**

2208 As *L. vannamei* post-larvae grow, they increase the influence of inert feed for its
2209 growth, but young animals (from PL1 forward) can take nutritional benefits from the
2210 presence of bioflocs and incorporate this food source into its tissues for growth. Thus,
2211 the presence of bioflocs in the culture environment of *L. vannamei* post-larvae from the
2212 early stage (after hatchery) can generate post-larvae of excellent quality, especially if it
2213 is possible to maintain microalgae together with bioflocs.

2214 The *Artemia* sp. presented a smaller contribution for shrimp growth than the
2215 other food sources. If it is related with practical issues in pre-nursery systems (PL1-
2216 PL30), it can be concluded that, in an appropriate co-feeding system (microalgae,
2217 bioflocs and feed), it is possible to reduce or even suspend the use of *Artemia* sp. as
2218 shrimp live food in this life stage. This would reduce the production costs and also the
2219 time and efforts used in its production.

2220 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2221 The authors are grateful for the financial support provided by the National
2222 Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Fishery and
2223 Aquaculture (MPA) and Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel
2224 (CAPES). W.Wasielesky Jr., Eduardo Ballester and P.C. Abreu are research fellows of
2225 CNPq.

2226 **REFERENCES**

- 2227 Abreu PC, Ballester ELC, Odebrecht C, Wasielesky W, Cavalli RO, Wilhelm G, Anesio
2228 A (2007) Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus*
2229 *paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and ^{15}N). Journal of Experimental
2230 Marine Biology and Ecology 347: 88-96
- 2231 Aminot A, Chaussepied M (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin.
2232 CNEXO, Brest
- 2233 AOAC (2000) Official Methods of Analysis of AOAC, 16ed. Patricia Cunniff (ed),
2234 Washington, DC
- 2235 APHA (American Public Health Association) (1998) Standard methods for the
2236 examination of water and wastewater (20th edn), Washington, DC
- 2237 Avnimelech Y (1999) C/N ratio as a control element in aquaculture systems.
2238 Aquaculture 176: 227-235
- 2239 Avnimelech Y (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge
2240 bioflocs technology ponds. Aquaculture 264:140–147
- 2241 Avnimelech Y & Kochba M (2009) Evaluation of nitrogen uptake and excretion by
2242 tilapia in biofloc tanks using ^{15}N tracing. Aquaculture 287:163-168
- 2243 Ballester ELC, Wasielesky W, Cavalli RO, Santos MHS, Abreu PC (2003) Influencia
2244 do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em
2245 sistemas de berçário. Atlântica 1:1-10
- 2246 Bendschneider K, Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric method for the
2247 determination of nitrite in sea water. J Mar Res. 11:87–96
- 2248 Burford MA, Preston NP, Glibert PM, Dennison WC (2002) Tracing the fate of ^{15}N -
2249 enriched feed in an intensive shrimp system. Aquaculture 206:199–216
- 2250 Burford MA, Sellars MJ, Arnold SJ, Keys SJ, Crocos PJ, Preston NP (2004)

2251 Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional
2252 requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-
2253 density rearing systems. *Aquaculture Research* 35:508–515

2254 Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination
2255 factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): The effect of diet isotopic values and applications for diet
2256 reconstruction. *Journal of Applied Ecology* 46:443-453

2257 Cobo M de L, Sonnenholzner S, Wille M, Sorgeloos P (2012) Ammonia tolerance of
2258 *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research* 1-6

2259 Dittel AL, Epifanio CE, Cifuentes LA, Kirchman, DL (1997) Carbon and Nitrogen sources
2260 for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove system. *Estuarine,
2261 Coastal and Shelf Science* 45: 629-637

2262 Ebeling JM, Timmons MB, Bisogni JJ (2006) Engineering analysis of the stoichiometry
2263 of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in
2264 aquaculture production systems. *Aquaculture* 257: 346-358

2265 FAO (2004) Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de
2266 postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. Roma:
2267 Documento Técnico de Pesca p. 450

2268 FAO (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma SOFIA pp24-26

2269 Fry B & Arnold C (1987) Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of the brown shrimp
2270 (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54:200-204

2271 Fry B (2006) Stable isotope ecology. Springer, New York, USA, p308

2272 Gamboa-Delgado J, Le Vay L (2009) Artemia replacement in co-feeding regimes for
2273 mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of
2274 inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon by stable isotopes.
2275 *Aquaculture* 297:128-135

- 2276 Gamboa-Delgado J, Rojas-Casas MG, Nieto-López MG, Cruz-Suárez LE (2013)
2277 Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein
2278 isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus*
2279 *vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture* 380-383:33-40
- 2280 Godoy LC, Odebrecht C, Ballester ELC, Martins TG, Wasielesky W (2012) Effect of
2281 diatom supplementation during the nursery rearing of *Litopenaeus vannamei*
2282 (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. *Aquaculture International* 20: 559-
2283 569
- 2284 Jaime-Ceballos BJ, Hernandez-Llamas A, Garcia-Galano T & Villarreal H (2006)
2285 Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for
2286 *Litopenaeus schmitii* larvae. *Aquaculture* 260:215-220
- 2287 Krummenauer D, Peixoto S, Cavalli RO, Poersch LH, Wasielesky W (2011)
2288 Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc
2289 technology system in southern Brazil at different stocking densities. *Journal of the*
2290 *World Aquaculture Society* 42: 726-733
- 2291 Kruskal WH & Wallis A (1952) Kruskal-Wallis one way analysis of variance. *Journal*
2292 *of the American Statistical Association* 47 (260): 583-621
- 2293 Lopes DLA, Suita S, Bueno C, Wasielesky W, Poersch LH (2012) Determinação da
2294 densidade de estocagem ótima do camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*
2295 produzido em tecnologia de bioflocos durante a fase de berçário. *Atlântica* 34(2):
2296 113-120
- 2297 McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift
2298 for stable isotope ratios of carbon, nitrogen and sulfur. *OIKOS* 102:378-390
- 2299 Middelburg JJ (2014) Stable isotopes dissect aquatic food webs from the top of the
2300 bottom. *Biogeosciences* 11: 2357-2371

2301 Nagano N. & Decamp O (2004) Ingestion of a ciliated protozoa by first feeding larval
2302 stage f Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research
2303 35:516-518

2304 Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliot M, Farrell AP, Forster I,
2305 Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD (2009) Feeding aquaculture in an
2306 era of finite resource. Proceedings of the National Academy of Sciences of the
2307 United States America (PNAS) 106(36): 15103-15110

2308 Parnell A, Inger R, Bearhop S, Jackson AL (2010) Source partitioning using stable
2309 isotopes: coping with too much variation. Plos One 5: e9672

2310 Peterson BJ & Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. Annual Review of
2311 Ecology and Systematics 18: 293-320

2312 Pearson DF, Levey DJ, Greenberg CH, Martinez del Rio C (2003) Effects of
2313 elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon
2314 isotopic signatures in an omnivorous songbird. Oecologia 135: 516–523

2315 Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models methods, and
2316 assumptions. Ecological Society of America 83:703-718

2317 Phillips DL, Gregg JW (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes.
2318 Oecologia 127: 171–179

2319 Phillips DL, Inger R, Bearhop S, Jackson AL, Moore JW, Parnell AC, Semmens BX,
2320 Ward EJ (2014) Best practices for use of stable isotope mixing models in food-
2321 web studies. Canadian Journal of Zoology 92: 823-835

2322 Ray AJ, Lewis BL, Browdy CL, Leffler JW (2010) Suspended solids removal to
2323 improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-
2324 based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture
2325 299:89–98

- 2326 Rossi F, Herman PMJ, Middelburg JJ (2004) Interspecific and intraspecific variation of
2327 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in deposit and suspension-feeding bivalves (*Macoma bolthica* and
2328 *Cerostodema edule*) evidence of ontogenetic changes in feeding mode *Macoma*
2329 *bolthica*. *Limnology and Oceanography*. 49:408-414.
- 2330 Samocha TM, Guajardo H, Lawrence AL, Castille FL, Speed M, Mckee DA, Page KI
2331 (1998) A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 165:
2332 233–242
- 2333 Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Ali AM, Burger JM, Almeida RV, Ayub Z,
2334 Harisanto M, Horowitz A, Brock DL (2007) Use of molasses as carbon source in
2335 limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*.
2336 *Aquacultural Engineering* 36:184–191
- 2337 Schwamborn R, Criales MM (2000) Feeding strategy and daily diet of juvenile pink
2338 shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in South Florida seagrass bed. *Marine*
2339 *Biology* 137:139-147
- 2340 Silva CF, Ballester ELC, Monserrat J, Geracitano L, Wasielesky W, Abreu PC (2008)
2341 Contribution of microorganisms to the biofilm nutrition quality: protein and lipid
2342 contents. *Aquaculture Nutrition* 14: 507-514
- 2343 Soares RB, Peixoto S, Wasielesky W, D'Incao F (2005) Feding rhythms and diet of
2344 *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil.
2345 *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 322:167-176
- 2346 Southgate PC, Partridge GJ (1998) Development of artificial diets for marine finfish
2347 larvae: problems and prospects. In: de Silva, SS (Ed), *Tropical Mariculture*.
2348 Academic Press, London, UK, pp151-170
- 2349 Strickland JDH & Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis.
2350 Fisheries Research Board of Canada. 2. ed. Ottawa: Bulletin 167 p311

- 2351 Suita S, Romano LA, Cardozo AP, Abreu PC, Wasielesky W (2015a) Development of
2352 the hepatopancreas and quality analysis of post-larvae Pacific white shrimp
2353 *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. *Aquaculture International*
2354 23:449-463
- 2355 Suita S, Ballester ELC, Abreu PC, Wasielesky W (2015b) Dextrose as carbon source in
2356 the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero exchange system.
2357 *Latin American Journal of Aquatic. Research. In press.*
- 2358 Tacon AGJ, Cody VJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE (2002)
2359 Effect of culture system shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets.
2360 *Aquaculture Nutrition* 8:121-137
- 2361 Thompson RL, Abreu PC, Wasielesky W (2002) Importance of biofilm for water
2362 quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203:263-278
- 2363 UNESCO (1983) Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
2364 *Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission*
- 2365 Utermohl H (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton metthodik.
2366 *Int. Ver. Theor. Angew. Limnology* 9:1-38
- 2367 Vanderklift MA & Ponsard S (2003) Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$
2368 enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136:169-182
- 2369 Wasielesky W, Atwood HI, Stokes A, Browdy CL (2006) Effect of natural production
2370 in brown water super-intensive culture system for Pacific white shrimp
2371 *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258: 396-403

2372

2373

2374

2375

CAPÍTULO III

2376

2377

2378 PRODUÇÃO DE PÓS-LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* EM SISTEMAS DE

2379 BIOFLOCOS EM DIFERENTES REGIMES DE ALIMENTAÇÃO

2380

2381

2382

2383

Sabrina Medeiros Suita

2384

Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

2385

Cx. Postal 474, CEP: 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

2386

smsuita@yahoo.com.br

2387

2388

2389

2390

2391

2392

2393

2394

2395

2396

2397

2398

2399

2400 **RESUMO**

2401 O objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de isótopos estáveis e a análise
2402 histológica do hepatopâncreas como ferramentas para determinar a contribuição de
2403 diferentes fontes de alimento para o crescimento e status nutricional de pós-larvas de
2404 *Litopenaeus vannamei* cultivadas em meio com bioflocos. O experimento teve duração
2405 de trinta dias, iniciando na a fase de pós-larva de um dia. As unidades experimentais
2406 (doze litros de volume útil) foram estocadas com 75 pós-larvas/litro e mantidas em um
2407 sistema de “*water table*”, para manutenção da temperatura. Os parâmetros físicos
2408 equímicos da água foram monitorados diariamente, nitrito, nitrato e fosfato
2409 semanalmente. Caracterizações microbiológicas dos bioflocos foram feitas nos dias
2410 zero, quinze e trinta, e coletas para análise de valores isotópicos $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ das
2411 diferentes fontes alimentares e de pós-larvas foram realizadas no último dia de
2412 experimento. Pós-larvas de trinta dias também foram coletadas para cortes histológicos
2413 do hepatopâncreas. Durante o período experimental foi detectado a colonização das
2414 paredes dos tanques por um biofilme, o qual foi considerado como fonte de alimento.
2415 Ao final do estudo, as fontes alimentares, incluindo o biofilme e os bioflocos formados
2416 foram coletados e seus valores isotópicos comparados com os valores de pós-larvas de
2417 *L. vannamei* cultivadas nos diferentes regimes de alimentação. Os resultados
2418 apresentaram-se compatíveis entre as duas ferramentas de análise e apontaram a
2419 importância da adição de alimento vivo, como *Artemia* sp. e /ou *C. muelleri* utilizadas
2420 em conjunto com a ração, para a boa sobrevivência e crescimento de pós-larvas de *L.*
2421 *vannamei* em sistemas de bioflocos. Apesar disto, não dispensa a importância da
2422 contribuição tanto do biofilme, quanto dos bioflocos no consumo alimentar da espécie e
2423 na qualidade da água no ambiente de cultivo. O consumo da microalga *C. muelleri* e de
2424 *Artemia* sp. contribuíram com intervalos semelhantes para o crescimento das pós-larvas,

2425 porém a microalga *C. muelleri* possui a vantagem de se manter no sistema sem a
2426 necessidade de constantes inoculações, por isto pode ser utilizada em substituição a
2427 *Artemia* sp. em sistemas de bioflocos.

2428 **Palavras-chave:** Artemia, Bioflocos, Hepatopâncreas, Isótopos estáveis, Microalgas.

2429

2430

2431

2432

2433

2434

2435

2436

2437

2438

2439

2440

2441

2442

2443 **INTRODUÇÃO**

2444 A tecnologia de bioflocos tem possibilitado o desenvolvimento da carcinocultura
2445 marinha em sistemas que operam com baixas ou nenhuma renovação de água (Crab *et*
2446 *al.* 2012). Este tipo de sistema é baseado na adição de uma fonte de carbono orgânico ao
2447 meio, e possibilita que o nitrogênio inorgânico, tóxico aos animais produzidos, seja
2448 incorporado pelas bactérias heterotróficas, as quais podem converter este produto tóxico
2449 excedente em biomassa microbiana (Ebeling *et al.* 2006). Além de melhorar a qualidade
2450 da água, reduzindo a necessidade de renovações constantes, a formação de uma biota
2451 natural, composta predominantemente por organismos heterotróficos, pode ser
2452 aproveitada como alimento para os organismos produzidos (Burford *et al.* 2004).

2453 O protocolo de produção em larvicultura e berçário de camarões exige que uma
2454 boa qualidade de água seja mantida, assim constantes renovações de água são
2455 necessárias, podendo chegar a 100 % do volume do tanque por dia (FAO 2004). Além
2456 do gasto energético, este tipo de processo também torna o sistema dependente de uma
2457 produção constante de biomassa algal para reposição a cada renovação, uma vez que
2458 microalgas são consideradas alimentos essenciais para as fases iniciais de vida de
2459 crustáceos (Brown *et al.* 1997). De acordo com Moss (1994) juvenis de *L. vannamei* são
2460 capazes de crescer quando cultivados utilizando apenas microalgas como fonte de
2461 alimento.

2462 Em sistemas de bioflocos, o tipo de microbiota predominante pode ser
2463 dependente de diversos fatores, entre eles, o tipo de carbono orgânico adicionado. Sabe-
2464 se que fontes mais lábeis, tais como dextrose são capazes de manter a penetração de luz
2465 na água por mais tempo, o que favorece a permanência da comunidade de microalgas no
2466 meio de cultivo (Suíta *et al.* 2015a). Burford *et al.* (2004) citam que juvenis de *L.*
2467 *vannamei* podem reter até 29 % de material floculado da água, contribuindo para o

2468 crescimento da espécie. Suita *et al.* (2015b) observam que pós-larvas recentes desta
2469 espécie, cultivadas neste tipo de sistema se enquadram em um padrão de qualidade
2470 superior aqueles cultivados em meio a água clara, sobretudo quanto a formação e
2471 atividade do hepatopâncreas.

2472 A observação do hepatopâncreas pode ser usada para avaliar condição
2473 nutricional dos camarões, pois este é um órgão de produção, síntese e armazenamento
2474 de nutrientes (FAO 2004), e a estrutura e espessura de seus túbulos podem ser
2475 indicativas de status nutricional (Suita *et al.* 2015b). A alimentação inadequada,
2476 sobretudo nas primeiras fases de vida de *L. vannamei* pode gerar prejuízos para a
2477 produção, causando deformidades nos túbulos, ausência de células e menor atividade
2478 deste órgão (Bell & Lightner 1988, Suita *et al.* 2015b).

2479 Acompanhar o consumo alimentar de camarões marinhos em estágios iniciais de
2480 vida é bastante difícil devido ao pequeno tamanho dos animais, além disto, a forma
2481 comumente utilizada para camarões adultos, que é a análise de conteúdo estomacal,
2482 permite verificar apenas o que os animais ingeriram momentos antes da coleta, porém
2483 nem sempre a ingestão de um determinado alimento contribui para o crescimento
2484 daquele organismo (Coman *et al.* 2006).

2485 Desta forma, é importante que indivíduos deste tamanho sejam avaliados de
2486 acordo com outros critérios e métodos de análise. Neste sentido, o uso da técnica de
2487 isótopos estáveis tem sido usado para estimar a retenção e incorporação dos nutrientes
2488 no tecido animal, inclusive em pós-larvas desta espécie (Gamboa-Delgado & Le Vay
2489 2009). Isto porque é possível, com uso de modelos de mistura, converter dados
2490 isotópicos das assinaturas de alimentos em estimativas de contribuição para o
2491 crescimento dos animais estudados (Philips *et al.* 2012).

2492 Entender em qual fase de vida determinado tipo de alimento é mais benéfico
2493 para os organismos produzidos é uma maneira de otimizar o cultivo, sobretudo em fases
2494 recentes de vida, onde diferentes tipos de alimentos e regimes de co-alimentação entre
2495 alimento vivo e inerte são geralmente utilizados (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009).
2496 Contudo não se sabe exatamente a contribuição de cada fonte para o desempenho dos
2497 camarões nesta fase de vida. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o
2498 desempenho de pós-larvas de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos, com diferentes
2499 regimes alimentares utilizando a técnica de isótopos estáveis e avaliando-se a estrutura
2500 dos túbulos do hepatopâncreas.

2501 **MATERIAL E MÉTODOS**

2502 **Obtenção dos animais**

2503 Náuplios de *Litopenaeus vannamei* foram adquiridos na empresa Aquatec
2504 localizada no estado do Rio Grande do Norte, sendo transportados até Rio Grande, Rio
2505 Grande do Sul, onde foram mantidos desde o estágio de Nauplio V até a metamorfose
2506 para pós-larva, no setor de Larvicultura de camarões marinhos da Estação Marinha de
2507 Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande, EMA-FURG. O experimento teve
2508 início com os camarões no estágio de PL1 (Pós-larva de um dia) e finalizado 30 dias
2509 após, quando atingida a idade de PL30.

2510 **Delineamento experimental**

2511 Os tratamentos foram divididos em um tratamento controle (RAM) onde foi
2512 fornecida ração comercial duas vezes ao dia e outras duas alimentações com náuplios
2513 congelados de *Artemia* sp., além da adição de microalgas no ambiente de cultivo. Um
2514 segundo tratamento apenas com utilização de ração e adição de microalgas foi
2515 denominado de RM, no qual foram ofertados quatro horários de ração comercial e
2516 desenvolvido na presença de microalgas, sem a oferta de *Artemia* sp.. Um terceiro

2517 tratamento, RA, teve o regime de alimentação dividido em dois horários com ração e
2518 dois com náuplios congelados de *Artemia* sp., sem a adição das microalgas e o quarto
2519 tratamento (R) desenvolvido sem a adição de alimento natural (*Artemia* sp. ou
2520 microalgas) apenas com a adição de ração comercial quatro vezes ao dia. O manejo
2521 alimentar foi adaptado de recomendações da FAO (2004). Em todos os regimes de
2522 alimentação foi realizada aplicação diária de probiótico (Pro-w/INVE®) (1,0 ppm).

2523 As unidades experimentais utilizadas foram tanques de plástico em formato “U”
2524 com volume útil de 12 litros cada. A densidade inicial de estocagem foi de 75 pós-
2525 larvas/litro. Os tratamentos contendo microalgas como parte do regime alimentar
2526 tiveram a adição inicial da microalga *Chaetoceros muelleri* na proporção de 5×10^4
2527 células/ml. Contagens diárias foram feitas e quando necessária reposição para
2528 manutenção da densidade inicial. As rações fornecidas durante o presente estudo foram
2529 Flake (INVE®, 150/300µm) da fase de PL₁ até PL₁₀ e após esta fase, substituída para
2530 40J (POTIMAR-GUABI®), peneirada para obter-se uma granulometria de 300 µm e
2531 fornecida entre as fases de PL₁₀ até PL₂₀ e, após esta fase, fornecida na granulometria
2532 de 500 µm.

2533 O experimento foi realizado em sistema de bioflocos, e os tratamentos testados
2534 tiveram três réplicas cada com duração de trinta dias. O experimento iniciou com
2535 inóculo de 5% de bioflocos, sem filtragem, por unidade experimental, proveniente de
2536 uma produção de adultos de *Litopenaeus vannamei* mantidos há dois meses no setor de
2537 maturação da EMA-FURG, cujas médias dos parâmetros de qualidade de água eram:
2538 $0,07 \pm 0,04$; $0,02 \pm 0,01$; $24 \pm 3,08$; $1,01 \pm 0,33$ mg/L para amônia total, nitrito, nitrato e
2539 fosfato, respectivamente, e $203,75 \pm 39,02$ mg/L de sólidos suspensos totais e $154 \pm 16,35$
2540 de alcalinidade.

2541 Não foram efetuadas renovações de água em nenhum dos tratamentos e a
2542 formação e manutenção dos bioflocos foi incentivada por fertilizações com carbono
2543 orgânico na forma de dextrose, de acordo com a concentração de amônia detectada no
2544 meio de cultivo (superior a 1,0 mg/L), seguindo a metodologia de Ebeling *et al.* (2006)
2545 e Suita *et al.* (2015a) . A concentração limite de amônia (1,0 mg/L) foi determinada
2546 conforme o nível de segurança estabelecido para pós-larvas do *Litopenaeus vannamei*
2547 (1,32 mg/L de N-AT) (Cobo *et al.* 2012).

2548 No ultimo dia experimental 50 PL's de cada unidade experimental foram
2549 medidas em comprimento (mm) e pesadas (mg) e os indivíduos remanescentes de cada
2550 unidade wxperimental foram contados para verificação da sobrevivência média final.

2551 **Tratamento da água e Parâmetros Físicos e Químicos**

2552 Foi utilizada água marinha (salinidade 30), previamente filtrada em filtros de 25,
2553 5 e 1 μm , clorada com hipoclorito de sódio a 15 ppm e declorada com ácido ascórbico
2554 (1,0 ppm). Após, a mesma foi tratada com EDTA (20 ppm), para evitar presença de
2555 metais pesados. Para manutenção da temperatura da água próxima aos 30°C, os tanques
2556 foram dispostos em uma “*water table*” e a água aquecida com aquecedores elétricos
2557 com termostato. A salinidade foi ajustada diariamente para próximo a 30, utilizando
2558 água doce da companhia de abastecimento local, previamente filtrada, tratada (conforme
2559 água marinha) e aquecida. A aeração foi suprida através de duas pedras porosas por
2560 tanque.

2561 Diariamente foram realizadas medidas de oxigênio dissolvido com YSI55
2562 oxímetro (Yellow Springs, OH, USA), temperatura (termômetro de mercúrio) e pH com
2563 YSI 100 pH-meter (Yellow Springs, OH, USA). Análise de amônia (N-(NH₃+NH₄⁺))
2564 foi realizada a cada dois dias (Unesco 1983). Semanalmente foram feitas medidas de
2565 nitrito (N-NO₂⁻) (Bendchneider & Robinson 1952), fosfato (P-PO₄³⁻) (Aminot &

2566 Chaussepied 1983). Alcalinidade (mg/L de CaCO₃) (APHA 1998) e nitrato (N-NO₃⁻)
2567 foram determinadas em coleta inicial e final (Aminot & Chaussepied 1983).

2568 **Caracterização dos bioflocos**

2569 Os bioflocos foram caracterizados mediante medição de sólidos suspensos totais
2570 (AOAC 2000) e por análises qualitativas e quantitativas da comunidade microbiana
2571 presentes nos bioflocos e na água do cultivo. Para isto foram coletados amostras de água
2572 de cada tanque, fixadas em formalina 4%, mantidos em frascos âmbar para posterior
2573 contagem e identificação de grupos de microrganismos presentes. Os grupos de
2574 microrganismos e microalgas foram caracterizados e quantificados com auxílio de
2575 microscópio invertido Zeiss Axiovert com magnificação de 200 x, onde alíquotas de 2,1
2576 mL de amostra foram colocadas em câmara de sedimentação e 50 campos aleatórios
2577 foram contados (Utermohl 1958).

2578 **Análises morfométrias do hepatopâncreas**

2579 Para as análises histológicas, dez animais de cada réplica foram coletados,
2580 fixados em solução Bouin por seis horas e após, preservados em álcool 70%. Todas as
2581 amostras foram processadas em processador automático 05 LUPE PT e mergulhados em
2582 Paraplast (Sigma). Após, os blocos foram cortados em micrótomo de 5 µm LUPETEC
2583 MRPO3 e corados com hematoxilina-eosina. Embora não tenham sido quantificadas a
2584 quantidade de células B na parede dos túbulos do hepatopâncreas, as mesmas foram
2585 comparadas entre os tratamentos quanto a presença ou ausência.

2586 Dez pós-larvas de cada tratamento foram usadas para análises morfométricas das
2587 paredes dos túbulos do hepatopâncreas, usando medições em dez tubulos de cada pós-
2588 larva, usando lentes (Carl Zeiss) em micrometros com 10x de magnificação (Weibel
2589 1980), com auxílio do software Axiovision 4.8.

2590 **Análise de isótopos estáveis**

2591 Coletas das diferentes fontes alimentares e das pós-larvas de *L. vannamei*, foram
2592 efetuadas no último dia experimental para determinar os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e
2593 $\delta^{13}\text{C}$. A coleta de bioflocos foi feita mediante retirada de um litro de água dos tanques e
2594 acondicionamento em beakers, esperado um tempo de 30 minutos e após, coleta do
2595 material decantado no fundo. As paredes dos tanques foram raspadas para coleta de
2596 biofilme. Todo material coletado foi acondicionado em frascos eppendorf, identificados
2597 e congelados.

2598 As amostras foram mantidas em ultra freezer (Quimis 80 v) em temperatura de
2599 25°C negativos e liofilizadas em Liofilizador (Liotop-L101/ Liobras®), por
2600 aproximadamente 10 horas, no Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas
2601 do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Em seguida, as amostras foram
2602 maceradas, pesadas ($1,0\text{ mg} \pm 0,2\text{ mg}$) e armazenadas em cápsulas de estanho. As
2603 análises da razão isotópica de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foram realizadas
2604 no UC Davis Stable Isotope Facility, CA. Os resultados das análises isotópicas foram
2605 quantificados de acordo com a notação delta:

$$2606 \quad \delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$$

2607 Onde R_{amostra} corresponde à razão entre isótopos pesado e leve da amostra e
2608 $R_{\text{padrão}}$ corresponde à razão entre isótopos pesados e leves do belemnito de Pee Dee e o
2609 ar atmosférico, padrões internacionais para carbono e nitrogênio, respectivamente.

2610 O modelo Bayesiano de misturas de isótopos (SIAR; Parnell *et al.* 2010) foi
2611 utilizado para obter as contribuições relativas das fontes alimentares ao crescimento dos
2612 camarões em períodos diferentes do cultivo. O fracionamento adotado foi de 0.4‰ para
2613 $\Delta^{13}\text{C}$ e 2.7‰ $\Delta^{15}\text{N}$ conforme valores utilizados anteriormente para pós-larvas de *L.*
2614 *vannamei* por Dittel *et al.* (1997).

2615 **Testes Estatísticos**

2616 Nos dados referentes ao desempenho zootécnico, qualidade da água e qualidade
2617 das pós-larvas foi aplicado teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis
2618 1952).

2619 Com base nos valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ foi estimada a contribuição de
2620 cada fonte alimentar na dieta de *L. vannamei*, através de modelos de mistura com
2621 abordagem bayesiana em R, no pacote SIAR (Parnell *et al.* 2010). Para inferir a
2622 contribuição das diferentes fontes na dieta foi estabelecido um modelo de mistura
2623 isotópica para cada tratamento (dia 30). Foram usados nos modelos cinco potenciais
2624 itens alimentares (Bioflocos, Flake (INVE[®]), 40J (POTIMAR GUABI[™]), *Artemia* sp.,
2625 *C. muelleri*). Ainda foi considerado como sexta fonte alimentar a presença do biofilme
2626 formado naturalmente em todas as réplicas. O intervalo de contribuição (IC) adotado foi
2627 de 95%.

2628 **RESULTADOS**

2629 **Qualidade da água**

2630 Os parâmetros de qualidade de água avaliados não apresentaram diferenças
2631 significativas entre os tratamentos. Apesar disto, no tratamento RM pode-se verificar as
2632 menores médias nas concentrações de amônia. As medias dos parâmetros de qualidade
2633 de água são apresentados na Tabela I e na Figura 1 são mostradas as concentrações
2634 medias de amônia obtida ao longo do tempo nos diferentes tratamentos, os quais
2635 tenderam a queda nas concentrações após a terceira semana experimental em todos os
2636 tratamentos. Os valores de sólidos suspensos totais nos dias zero, 15 e 30 são
2637 apresentados na Figura 2.

2638 Tabela I- Valores médios (\pm DP) das variáveis físicas químicas de qualidade de água,
2639 registrados no cultivo de pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei* nos

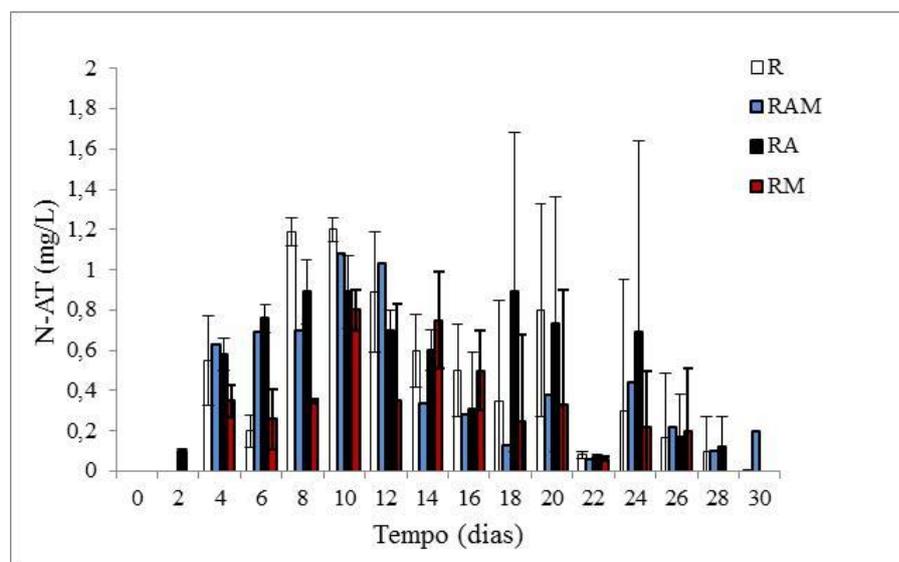
2640 diferentes tratamentos, onde: R=ração, RAM= ração+ *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA=
 2641 ração+ *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

Parâmetros	R	RAM	RA	RM
O ₂ D (mg/L)	5,88±0,12	5,8±0,21	5,98±0,03	5,76±0,32
Temperatura (°C)	27,9±1,98	28,1±2,18	28,1±1,98	27,9±2,11
Salinidade	31,09±2,45	30,44±2,45	30,4±2,5	30,3±8,11
pH	8,09±0,18	8,13±0,17	8,1±0,17	8,11±0,18
SST (mg/L)	1154±995,57	1240±999,67	1173±922,04	1232,55±974
Alcalinidade (CaCO ₃)	179,16±17,68	179,16±17,68	183,33±11,78	183,33±11,78
Amônia (mg/L)	0,43±0,4	0,39±0,34	0,47±0,34	0,27±0,25
Nitrito (mg/L)	2,52±2,6	2,9±3,21	3,67±4,12	2,47±2,61
Nitrato (mg/L)	5,73±6,41	7,58±7,49	5,99±6,98	5,19±6,39
Fosfato (mg/L)	1,35±1,17	1,53±1,34	1,49±1,37	1,19±1,04

2642

2643

2644

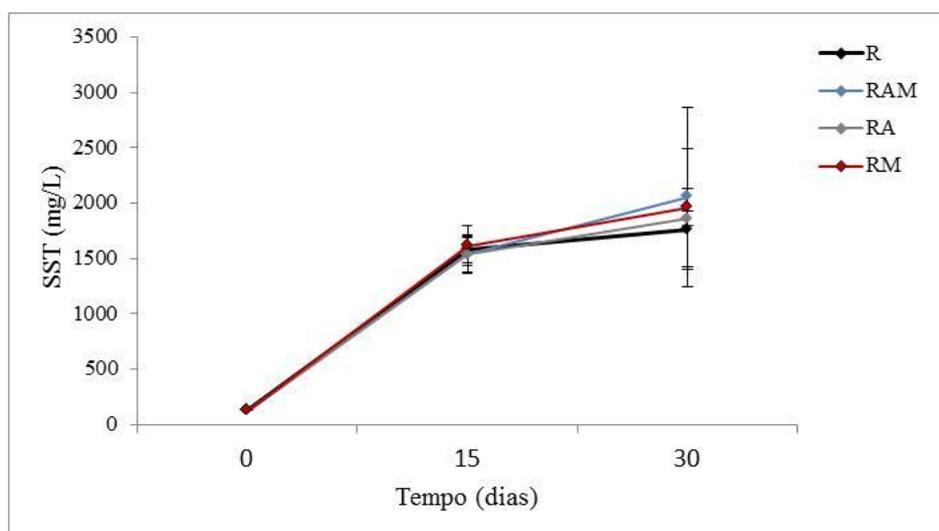


2645

2646 Figura 1- Valores médios (±DP) de amônia (N-AT) ao longo do tempo no cultivo de
 2647 pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, nos diferentes tratamentos, onde:
 2648 R=ração, RAM= ração+ *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração+ *Artemia* sp. e RM=
 2649 ração + *C. muelleri*.

Parâmetros	R	RAM	RA	RM
O ₂ D (mg/L)	5,88±0,12	5,8±0,21	5,98±0,03	5,76±0,32
Temperatura (°C)	27,9±1,98	28,1±2,18	28,1±1,98	27,9±2,11
Salinidade	31,09±2,45	30,44±2,45	30,4±2,5	30,3±8,11
pH	8,09±0,18	8,13±0,17	8,1±0,17	8,11±0,18
SST (mg/L)	1154±995,57	1240±999,67	1173±922,04	1232,55±974
Alcalinidade (CaCO ₃)	179,16±17,68	179,16±17,68	183,33±11,78	183,33±11,78
Amônia (mg/L)	0,43±0,4	0,39±0,34	0,47±0,34	0,27±0,25
Nitrito (mg/L)	2,52±2,6	2,9±3,21	3,67±4,12	2,47±2,61
Nitrato (mg/L)	5,73±6,41	7,58±7,49	5,99±6,98	5,19±6,39
Fosfato (mg/L)	1,35±1,17	1,53±1,34	1,49±1,37	1,19±1,04

2650



2651

2652 Figura 2- Valores médios (\pm DP) de sólidos em suspensão (SST) ao longo do tempo no
 2653 cultivo de pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, nos diferentes
 2654 tratamentos, onde: R=ração, RAM= ração+ *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração+
 2655 *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

Parâmetros	R	RAM	RA	RM
O ₂ D (mg/L)	5,88±0,12	5,8±0,21	5,98±0,03	5,76±0,32
Temperatura (°C)	27,9±1,98	28,1±2,18	28,1±1,98	27,9±2,11
Salinidade	31,09±2,45	30,44±2,45	30,4±2,5	30,3±8,11
pH	8,09±0,18	8,13±0,17	8,1±0,17	8,11±0,18
SST (mg/L)	1154±995,57	1240±999,67	1173±922,04	1232,55±974
Alcalinidade (CaCO ₃)	179,16±17,68	179,16±17,68	183,33±11,78	183,33±11,78
Amônia (mg/L)	0,43±0,4	0,39±0,34	0,47±0,34	0,27±0,25
Nitrito (mg/L)	2,52±2,6	2,9±3,21	3,67±4,12	2,47±2,61
Nitrato (mg/L)	5,73±6,41	7,58±7,49	5,99±6,98	5,19±6,39
Fosfato (mg/L)	1,35±1,17	1,53±1,34	1,49±1,37	1,19±1,04

2656

2657 **Desempenho zootécnico**

2658 Os maiores percentuais médios de sobrevivência foram observados no
2659 tratamento RAM (92,86%), entretanto sem apresentar diferenças significativas dos
2660 tratamentos RA (89,99%) e RM (77,38%). No tratamento R houve uma menor
2661 sobrevivência (49,38%) e maior peso médio final (41 mg) do que os tratamentos RA e
2662 RAM, porém apresentou biomassa significativamente inferior apenas ao tratamento
2663 RAM. Os demais resultados de desempenho zootécnico estão apresentados na Tabela II.
2664 Tabela II- Valores médios (\pm DP) dos parâmetros de desempenho zootecnico registrados
2665 no cultivo de pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, nos diferentes
2666 tratamentos, onde: R=ração, RAM= ração+ *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração+
2667 *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

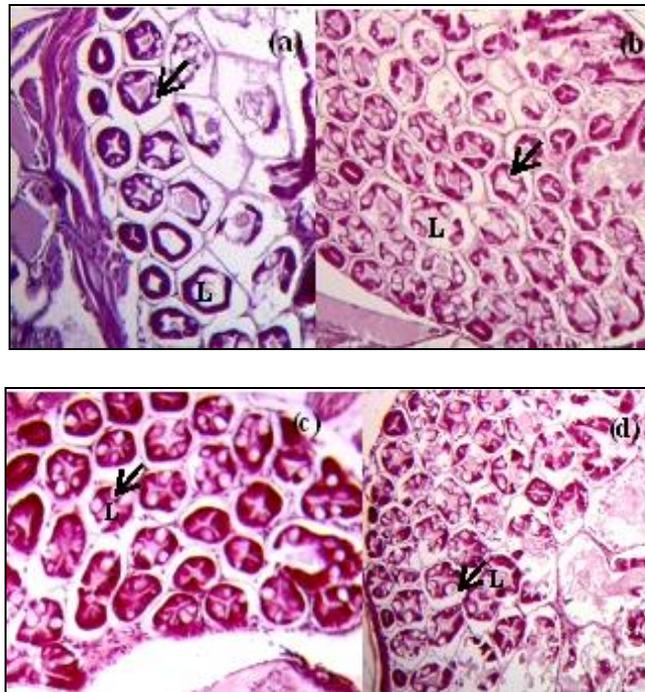
Parâmetros	R	RAM	RA	RM
Tamanho inicial (mm)	5 \pm 0,5	5 \pm 0,5	5 \pm 0,5	5 \pm 0,5
Peso Inicial (mg)	0,51 \pm 0,4	0,51 \pm 0,4	0,51 \pm 0,4	0,51 \pm 0,4
Tamanho Final (mm)	20,14 \pm 0,5 ^a	19,24 \pm 0,95 ^{ab}	17,19 \pm 0,41 ^b	19,05 \pm 1,58 ^{ab}
Peso Final (mg)	41 \pm 8 ^a	30 \pm 2 ^b	20 \pm 4 ^c	30 \pm 3 ^{ab}
Sobrevivencia (%)	49,38 \pm 11,35 ^a	92,86 \pm 4,95 ^b	89,99 \pm 6,83 ^b	77,38 \pm 13,76 ^b
Biomassa Final (g)	13,72 \pm 0,7 ^a	18,66 \pm 2,17 ^b	14,19 \pm 2,09 ^{ab}	16,96 \pm 3,34 ^{ab}

2669 **Análises Histológicas**

2670 A espessura das paredes dos túbulos do hepatopâncreas de pós-larvas no
2671 tratamento R foi menor do que os demais, porém não foram detectadas diferenças
2672 significativas entre os tratamentos. Além disto, embora não tenha sido efetuada a
2673 quantificação das células nas paredes dos túbulos do hepatopâncreas, neste mesmo
2674 tratamento foi verificada uma menor quantidade das células B, quando comparado aos
2675 demais tratamentos, porém os túbulos do hepatopâncreas ainda apresentaram material
2676 digestivo no interior do lúmen, indicando processo digestivo. Na Figura 3 (a, b, c e d)
2677 são apresentadas imagens dos túbulos nos diferentes tratamentos. Os resultados

2678 morfométricos referente à espessura da parede dos túbulos são apresentados na Figura
2679 4.

2680

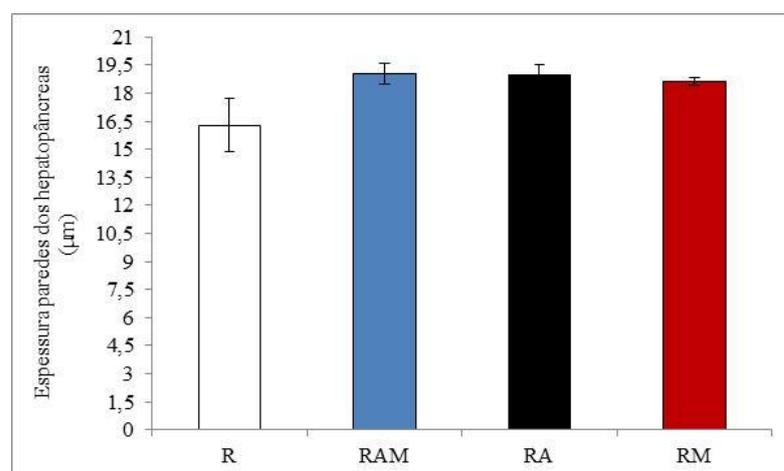


2681

2682 Figura 3- Cortes transversais do hepatopâncreas ressaltando a formação dos túbulos em
2683 pós-larvas de *L. vannamei*, com magnificação de 100x, nos tratamentos R (a), RAM (b),
2684 RA (c) e RM (d), onde L=Lúmen, setas indicam células B.

2685

2686



2687 Figura 4- Espessura das paredes dos túbulos do hepatopâncreas (μm) (Média \pm DP) de
2688 pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* nos tratamentos nos tratamentos R, RAM, RA e
2689 RM.

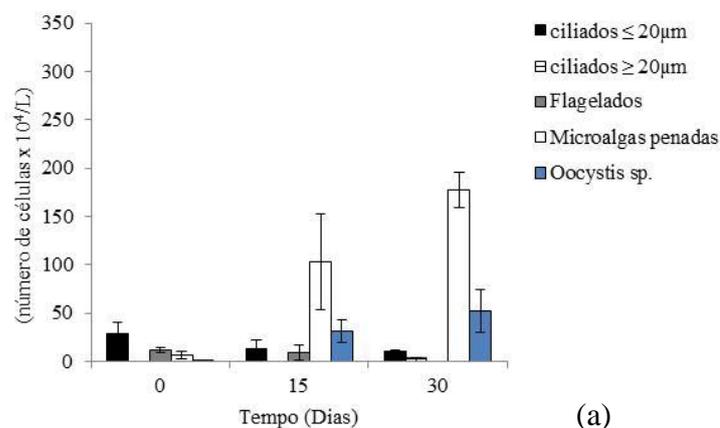
2690 **Microrganismos**

2691 Durante o período experimental foi detectada a formação de um biofilme na
2692 parede dos tanques de todos as unidades experimentais. Este, então, foi considerado
2693 como fonte alimentar, uma vez que foram observadas pós-larvas predando
2694 constantemente sobre este substrato.

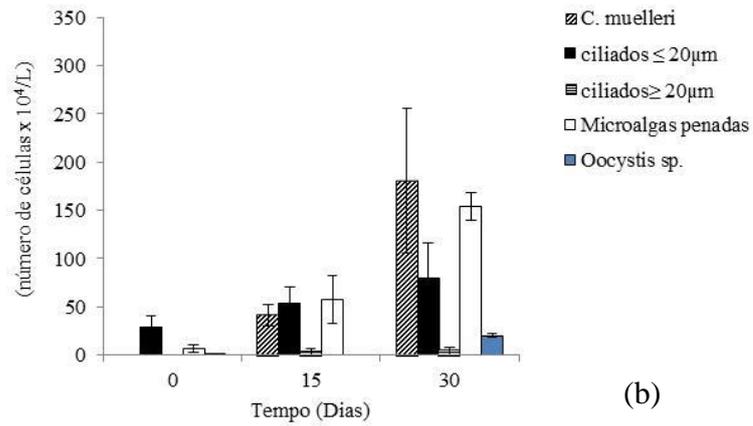
2695 Todos os tratamentos registraram a presença da microalga *Oocystis* sp. no
2696 ambiente de cultivo, exceto no tratamento RM. A abundância de microalgas *C. muelleri*
2697 aumentou ao longo do tempo no tratamento RAM em maior densidade do que no
2698 tratamento RM. O tratamento R foi o único a registrar a presença de ciliados $\geq 20 \mu\text{m}$ e
2699 o tratamento RA a presença de nematóides.

2700 Os demais microrganismos constituintes dos bioflocos foram ciliados $\leq 20 \mu\text{m}$,
2701 flagelados e microalgas penadas, conforme apresentado na Figura 5.

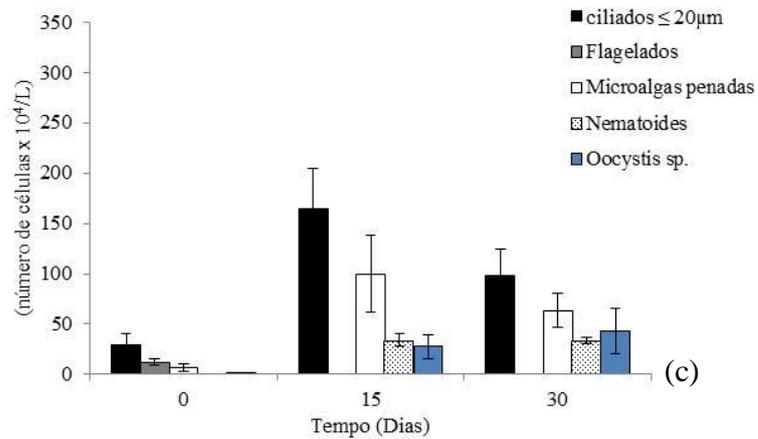
2702



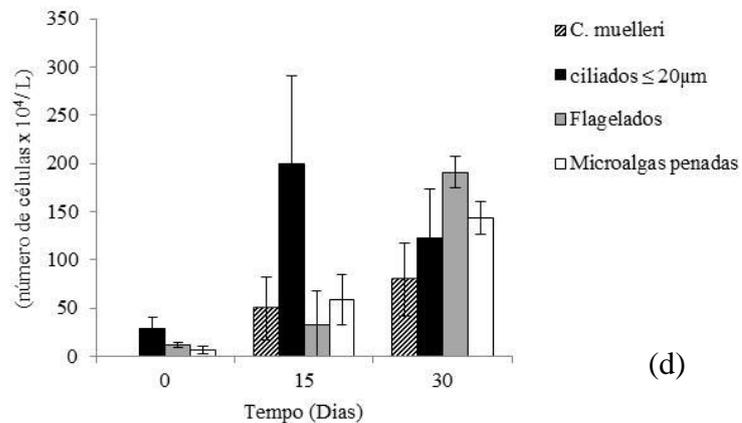
2703



2704



2705
2706



2707
2708

2709 Figura 5- Densidade de microrganismos (Média ± DP) nos diferentes tratamentos, onde:

2710 R= ração (a), RAM= ração + *C. muellerii* + *Artemia* sp. (b), RA= ração + *Artemia* sp.

2711 (c) e RM= ração+ *C. muellerii* (d).

2712

Isótopos Estáveis

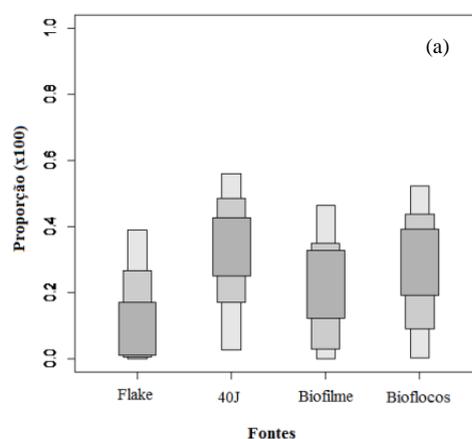
2713 Os tratamentos RAM e RA, apresentaram um IC semelhante para *Artemia* sp.
 2714 (IC= 0-30 e 0-37%, respectivamente), o mesmo padrão foi verificado em relação ao IC
 2715 da microalga *C. muelleri* para os tratamentos RAM e RM (IC=0-33 e 0-35%). A ração
 2716 Flake (@INVE) teve maior IC para o tratamento R (IC= 0-43%), quando comparada aos
 2717 demais tratamentos, já a ração 40J teve IC maior no tratamento RM (IC= 4-64%). A
 2718 presença do alimento natural oriundos dos bioflocos teve importância mais expressiva
 2719 nos tratamentos R e RM (IC= 0-57 e 2-57%, respectivamente). O IC mais expressivo
 2720 do biofilme foi de 0-51% no tratamento R. Na Tabela III são apresentados os intervalos
 2721 de contribuição de cada fonte alimentar para cada tratamento. A proporção de
 2722 contribuição de cada fonte nos diferentes tratamentos é apresentada nas Figura 6.

2723 Tabela III. Intervalo de contribuição (IC) das diferentes fontes alimentares ao longo do
 2724 cultivo do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, nos tratamentos R, RAM, RA e RM.

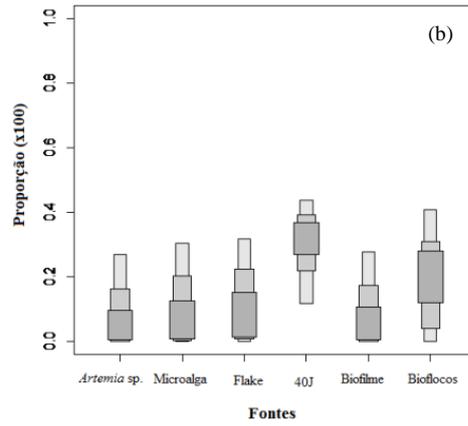
Tratamentos	<i>Artemia</i> sp.	<i>C. muelleri</i>	Flake	40J	Biofilme	Bioflocos
R	N.O	N.O	0-43%	0-57%	0-51%	0-57%
RAM	0-30%	0-33%	0-35%	8-42%	0-30%	0-45%
RA	0-27%	N.O	0-36%	17-50%	0-27%	0-50%
RM	N.O	0-35%	0-37%	4-64%	0-34%	2-57%

2725

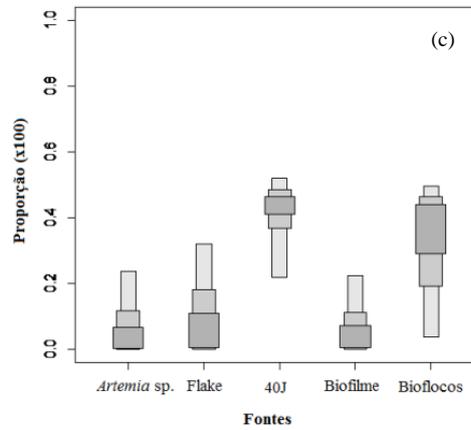
2726 *N.O. Não ofertado como fonte de alimento



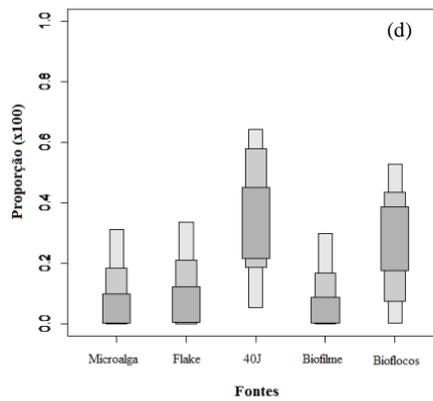
2727



2728



2729



2730

2731 Figura 6- Valores médios (Proporção x 100%) da contribuição das diferentes fontes
 2732 alimentares fornecidas no cultivo de pós-larvas camarão-branco *Litopenaeus vannamei*,
 2733 onde Tratamento R (a), Tratament RAM (b), Tratamento RA (c) e Tratamento RM (d)
 2734 em sistema sem renovação de água.

2735 **DISCUSSÃO**

2736 Microalgas são eficientes no controle de produtos nitrogenados, pois utilizam a
2737 amônia disponível na água para formar nova biomassa (Thompson *et al.* 2002), sendo
2738 responsáveis pelos processos de ciclagem de nutrientes dissolvidos no meio (Derner
2739 2006). A remoção de nutrientes também pode ser feita pelos componentes do biofilme,
2740 os quais são definidos por uma matriz composta por microrganismos que colonizam
2741 uma superfície submersa (Thompson *et al.* 2002), estes biofilmes podem ser
2742 constituídos de bactérias, cianobactérias filamentosas, microalgas, protozoários e
2743 nematoides (Ballester *et al.* 2007). No presente estudo, o biofilme formou-se
2744 naturalmente utilizando as paredes dos tanques como superfície de colonização.

2745 As bactérias nitrificantes presentes no biofilme também são importantes na
2746 ciclagem de nutrientes e auxiliam no processo de nitrificação no ambiente (Bratvold &
2747 Browdy 2001). A fertilização com carbono orgânico, auxiliando na formação dos
2748 bioflocos, também é um método eficaz de controle de compostos nitrogenados
2749 (Avnimelech 1999), e esta quando feita de maneira que evite a alta turbidez da água,
2750 como é o caso da dextrose, ainda pode auxiliar na manutenção de organismos
2751 autotróficos no ambiente, o que é benéfico à produção, sobretudo nas fases iniciais de
2752 vida (Suita *et al.* 2015a).

2753 No presente estudo, as baixas concentrações de produtos nitrogenados ao longo
2754 do período experimental, com quedas mais acentuadas após a terceira semana, pode ter
2755 sido efeito da presença tanto do biofilme quanto dos bioflocos. Além destes dois
2756 componentes do sistema, os tratamentos RAM e RM ainda tiveram o aporte de
2757 microalgas, creditando-se a isto, o fato de terem sido obtidas menores concentrações de
2758 amônia no tratamento RM, que embora não tenha se diferenciado estatisticamente dos
2759 demais tratamentos, mostrou concentrações mais controladas durante a maior parte do

2760 período experimental, obtendo média de concentração final menor. O tratamento RAM,
2761 embora com aporte de microalgas apresentou médias de amônia maiores do que o
2762 tratamento RM, isto provavelmente devido a adição de *Artemia* sp., alimento que pode
2763 contribuir na deterioração da qualidade da água.

2764 Até o momento, a *Artemia* sp. é considerado um alimento imprescindível nas
2765 fases iniciais de vida de camarões marinhos (FAO 2004), por ser fonte de nutrientes
2766 essenciais para organismos marinhos e por apresentar alta digestibilidade e estabilidade
2767 na coluna d'água (Léger *et al.* 1986), porém o uso desta fonte pode ser limitada pelo
2768 alto custo de produção, pouca disponibilidade e possível vetorização de doenças
2769 (Naylor *et al.* 2009). Além de contribuir com a degradação da qualidade da água,
2770 fazendo com que renovações constantes de água sejam necessárias. Desta forma,
2771 pesquisas devem ser direcionadas não apenas à qualidade do alimento ofertado, mas à
2772 possibilidade de manutenção da disponibilidade de alimento no ambiente, sem sofrer
2773 deterioração e sem a necessidade de inoculações sucessivas.

2774 O consumo de organismos do biofilme, tais como de microalgas, diatomáceas e
2775 nematóides pode contribuir positivamente com o crescimento de camarões peneídeos
2776 (Ballester *et al.* 2003). Burford *et al.* (2004) em estudo com pós-larvas de *L. vannamei*
2777 cita que o biofilme contribuiu substancialmente (39-53%) no total exigido de C e N
2778 demonstrando os benefícios do uso de substratos artificiais. Pós-larvas de *L. vannamei*
2779 são seletivas quando trata-se de predação agregados microbianos e são capazes de obter C
2780 e N de várias fontes diferentes (Dittel *et al.* 1997). Partículas pequenas com tamanho
2781 entre 0,5 e 5 µm tais como microalgas e flocos microbianos podem contribuir com a
2782 alimentação de juvenis de *L. vannamei* (Moss & Pruder 1995).

2783 As diatomáceas são excelentes fontes proteicas (Silva *et al.* 2008) e facilmente
2784 digeríveis devido ao baixo conteúdo de fibras (Moss *et al.* 2000). Também a presença

2785 de nematoides e protozoários pode ser um importante incremento nutricional, pois estes
2786 sintetizam ácidos graxos poli-insaturados de cadeias longas (Zhukova & Kharlamenko
2787 1999).

2788 O tratamento RM teve menor densidade da microalga *C. muelleri* do que o
2789 RAM, isto pode ser explicado pela disponibilidade de *Artemia* sp. no tratamento RAM,
2790 uma vez que pode-se notar que quanto maior o número de fontes ofertadas, mais
2791 uniformemente o IC de cada fonte foi distribuído. O tratamento RM foi o único a não
2792 apresentar a presença da microalga *Oocystis* sp., esta espécie forma colônias e tem
2793 capacidade remoção de N e P (Zarzo *et al.* 2014) e de CO₂ (Takeuchi *et al.* 1992),
2794 porém não se sabe se este tipo de microalga pode ter contribuição para o desempenho de
2795 camarões. No presente estudo, a presença desta espécie parece ter sido inibida pela
2796 adição de *C. muelleri* no tratamento RM.

2797 O tratamento RAM apresentou os melhores índices de desempenho, conforme
2798 já era esperado, uma vez que forneceu todas as fontes de alimento convencionalmente
2799 utilizadas nesta fase de vida. O tratamento R diferiu de todos os demais tratamentos,
2800 obtendo baixas taxas de sobrevivência e menores biomassas finais. Sabe-se que as
2801 rações artificiais, embora possam englobar uma série de nutrientes, nem sempre estes
2802 são suficientes para suprir as exigências de consumo da espécie alvo (Wyk 1999),
2803 podendo não apresentar boa digestibilidade, quando comparadas a alimentos naturais
2804 como, por exemplo, às microalgas, que no caso de *C. muelleri* pode alcançar 94% de
2805 digestibilidade (Jaime-Ceballos *et al.* 2006).

2806 Godoy *et al.* (2012) citam que camarões alimentados em meio a microalgas
2807 tiveram menor consumo de ração e maior peso. Desta forma, o regime de co-
2808 alimentação tem sido recomendado para fases iniciais de vida de *L. vannamei*,
2809 sobretudo em relação a alimento inerte e *Artemia* sp. (Gamboa-Delgado & Le Vay

2810 2009), no entanto, ainda pouco se sabe sobre o quanto cada alimento pode contribuir
2811 para o crescimento da espécie alvo.

2812 O tratamento RM teve peso final significativamente maior do que RA e demais
2813 resultados semelhantes a RAM, o que pode indicar que o cultivo pode ser desenvolvido
2814 com microalgas em substituição total ou parcial a *Artemia* sp. O tratamento R
2815 apresentou IC semelhante entre a ração 40J, biofilme e bioflocos, sugerindo que pós-
2816 larvas, sempre se beneficiem da adição de uma fonte de alimento natural mesmo com o
2817 consumo de ração, contudo, os resultados de produção nos mostram que durante esta
2818 fase de vida, é imprescindível o uso de co-alimentação, utilizando-se de ração artificial
2819 e uma fonte adicional como *Artemia* sp. ou *C. muelleri*. Tanto o biofilme, quanto os
2820 bioflocos presentes neste trabalho apresentaram-se como ótimas fontes complementares
2821 de alimento, contribuindo substancialmente para o crescimento das pós-larvas quando
2822 fornecidas apenas em regime de co-alimentação com ração.

2823 O pior desempenho obtido no tratamento R corrobora com os resultados obtidos
2824 a partir das análises histológicas dos túbulos do hepatopâncreas, onde neste tratamento
2825 as paredes dos túbulos apresentaram-se mais finas, com presença de poucas células B e
2826 pouco material extravasado para o lúmen. As células B estão relacionadas com a
2827 digestão intracelular e quando ocorrem em grande número são bons indicativos de
2828 atividade digestiva (Marcolin *et al.* 2008). Estas células possuem um grande vacúolo e
2829 com a digestão ficam mais ativas para processar nutrientes e após a assimilação
2830 extravasam material para o lúmen (Al-Mohanna & Nott 1986). Desta forma, os
2831 resultados de análises de isótopos estáveis e análises histológicas do hepatopâncreas
2832 fornecem resultados compatíveis entre si, indicando a importância de alimentos como
2833 *C. muelleri* e *Artemia* sp. para o bom desempenho de pós-larvas de *L. vannamei*
2834 produzidas em meio à bioflocos. Contudo foi possível observar que em sistemas de

2835 bioflocos não há a necessidade da adição destas duas fontes em co-alimentação com
2836 ração, e em caso de substituição é possível que a *Artemia* sp. seja substituída pela
2837 microalga *C. muelleri*.

2838 **CONCLUSÕES**

2839 A oferta da ração artificial, embora contribua com uma parcela importante do
2840 consumo alimentar de pós-larvas de *L. vannamei*, apenas torna-se totalmente eficaz em
2841 regime de co-alimentação com fontes de alimento natural, como *Artemia* sp. ou *C.*
2842 *muelleri*. Estas duas fontes são benéficas em regime de co-alimentação com ração,
2843 porém devido aos problemas relacionados com a produção e oferta de *Artemia* sp.,
2844 mediante os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o uso da
2845 microalga *C. muelleri* pode ser eficiente e utilizado em substituição a *Artemia* sp., em
2846 sistema de bioflocos.

2847 A microalga *C. muelleri* oferece nutrientes suficientes para assimilação e
2848 crescimento de pós-larvas, além disto, neste tipo de sistema são capazes de crescer e se
2849 manter no ambiente sem a necessidade de inoculações sucessivas, contribuindo ainda
2850 para os parâmetros de qualidade da água.

2851 Os bioflocos e o biofilme formados no ambiente de produção são boas
2852 ferramentas de manutenção de qualidade da água e contribuem com a alimentação das
2853 pós-larvas de *L. vannamei*, contudo ainda devem ser ofertados em co-adição de outra
2854 fonte viva de alimento e ração.

2855

2856 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 2857 AL-MOHANNA, SY & JA NOTT. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of
2858 *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine*
2859 *Biology*, 101: 535-544.
- 2860 AMINOT A, CHAUSSEPIED M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu
2861 marin. CNEXO, Brest
- 2862 AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC, 16ed. Patricia Cunniff (ed),
2863 Washington, DC.
- 2864 APHA (American Public Health Association). 1998. Standard methods for the
2865 examination of water and wastewater (20th edn), Washington, DC.
- 2866 AVNIMELECH, Y. 1999. C/N ratio as a control element in aquaculture systems.
2867 *Aquaculture*, 176: 227-235
- 2868 BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI, MHS SANTOS, PC ABREU.
2869 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus*
2870 *paulensis* em sistemas de berçário. *Atlantica*, 1:1-10.
- 2871 BALLESTER, ELC , W WASIELESKY, RO CAVALLI, PC ABREU. 2007. Nursery
2872 of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates:
2873 Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269:355-362.
- 2874 BELL, TA & D LIGHTNER. 1988. Manual de Histología del camarón Penaeido
2875 normal. *World Aquaculture Society*. Baton Rouge, USA.
- 2876 BENDSCHNEIDER K & RJ ROBINSON. 1952. A new spectrophotometric method for
2877 the determination of nitrite in sea water. *J Mar Res.* 11:87-96.
- 2878 BRATVOLD, D, CL BROWDY. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces
2879 (AqaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive
2880 *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195:81-94.

2881 BURFORD, MA, MJ SELLARS, SJ ARNOLD, SJ KEYS, PJ CROCOS, NP
2882 PRESTON. 2004. Contribution of the natural biota associated with substrates to the
2883 nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in
2884 high-density rearing systems. *Aquaculture Research*, 35:508–515.

2885 BROWN, MR, SW JEFFREY, JK VOLKMAN, GA DUNSTAN. 1997. Nutritional
2886 properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151:315-331.

2887 CRAB R, T DEFOIRDT, P BOSSIER & W VERSTRAETE. 2012. Biofloc technology
2888 in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356–357:351–
2889 356.

2890 COBO, M de L, S SONNENHOLZNER, M WILLE, P SORGELOOS. 2012. Ammonia
2891 tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 1-6.

2892 COMAN, FE, RM CONNOLLY, SE BUNN & NP PRESTON. 2006. Food sources of
2893 the sergestid crustacean, *Acetes sibogae*, in shrimp ponds. *Aquaculture*, 259:222-
2894 233.

2895 DERNER, RB, S OHSE, M VILLELA, S MATOS de CARVALHO, R FETT. 2006.
2896 Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 36(6):1959-1967.

2897 DITTEL, AL, CE EPIFANIO, LA CIFUENTES, DL KIRCHMAN. 1997. Carbon e
2898 Nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove
2899 system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 45: 629-637.

2900 EBELING, JM, MB Timmons, JJ Bisogni. 2006. Engineering analysis of the
2901 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of
2902 ammonia-nitrogen in aquaculture production systems. *Aquaculture*, 257: 346-358.

2903 FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de
2904 postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en America Latina. Roma:
2905 Documento Tecnico de Pesca. 450p.

2906 GAMBOA-DELGADO, J, L LE VAY. 2009. Artemia replacement in co-feeding
 2907 regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional
 2908 contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon by stable
 2909 isotopes. *Aquaculture*, 297:128-135.

2910 GODOY, LC, C ODEBRECHT, ELC BALLESTER, TG MARTINS, W
 2911 WASIELESKY. 2012. Effect of diatom supplementation during the nursery rearing
 2912 of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system.
 2913 *Aquaculture International*, 20: 559-569.

2914 JAIME-CEBALLOS, BJ, A HERNANDEZ-LLAMAS, T GARCIA-GALANO & H
 2915 VILLARREAO. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis*
 2916 meal in diets for *Litopenaeus schmitii* larvae. *Aquaculture*, 260:215-220.

2917 KRUSKAL, WH & ALLEN WALLIS. 1952. Kruskal-Wallis one way analysis of
 2918 variance. *Jour. of the Amer. Stat. Assoc.*, 47 (260):583-621.

2919 LÉGER, P, DA BENGSTON, KL SIMPSON, P SORGELOOS. 1986. The use and
 2920 nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*,
 2921 24:521-623.

2922 MARCOLIN, C da R, CRG CARQUEIJA, S de OTOZETTO, DV OLIVEIRA, AMA
 2923 CÔRREA.. 2008. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus*
 2924 (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos estádios de
 2925 intermuda e pré-muda inicial. *Rev. Brasil. Zooc.*, 10(2): 97-104.

2926 MOSS, S M, BR LEAMASTER, & JN SWEENEY. 2000. Relative abundance and
 2927 species composition of gram-negative, anaerobic bacteria associated with the gut of
 2928 juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in oligotrophic well water and
 2929 eutrophic pond water. *Jour. of the World Aquac. Soc.*, 31:255–263.

2930 MOSS, SM & GD PRUDER. 1995. Characterization of organic particles associated
2931 with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under
2932 intensive culture conditions. *Jour. of Exper. Mar. Biol. and Ecol.*, 187:175-191.

2933 MOSS, SM. 1994. Growth rates, nucleic acid concentrations, and RNA/DNA ratios of
2934 juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, fed different algal diets. *Jour. of*
2935 *Exper. Mar. Biol. and Ecol.*, 182:191-204.

2936 NAYLOR, RL, RW HARDY, DP BUREAU, A CHIU, M ELLIOT, AP FARRELL, I
2937 FORSTER, DM GATLIN, RJ GOLDBURG, K HUA, PD NICHOLS. 2009.
2938 Feeding aquaculture in an era of finite resource. Proceedings of the National
2939 Academy of Sciences of the United States America (PNAS), 106(42): 36p.

2940 PHILIPS, DL. 2012. Converting isotope values to diet composition: the use of mixing
2941 models. *Jour. of Mamm.*, 93(2):342-352.

2942 PARNELL, A, R INGER, S BEARHOP & AL JACKSON. 2010. Source partitioning
2943 using stable isotopes: coping with too much variation. *PlosOne*, 5 (3).

2944 STRICKLAND, JDH & TR PARSONS.1972. A practical handbook of seawater
2945 analysis. Fisheries Research Board of Canada. 2. ed. Ottawa: Bulletin 167. 311p.

2946 SILVA, CF, ELC BALLESTER, J MONSERRAT, L GERACITANO, W
2947 WASIELESKY & PC ABREU. 2008. Contribution of microorganisms to the
2948 biofilm nutrition quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition*, 14: 507-
2949 514.

2950 SUITA, SM, ELC BALLESTER, PC ABREU, W WASIELESKY. 2015a. Dextrose as
2951 carbon source in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero
2952 exchange system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, (43)3.

2953 SUITA, SM, LA ROMANO, AP CARDOZO, PC ABREU, W WASIELESKY. 2015b.
2954 Development of the hepatopancreas and quality analysis of postlarvae Pacific white

2955 shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. *Aquaculture*
2956 *International*, 23:449-463.

2957 TAKEUSHI, T, K UTSUNOMIYA, K KOBAYASHI, M OWADA, I KARUBE. 1992.
2958 Carbon dioxide fixation by unicellular green alga *Oocystis* sp. *Jour. of Biot.*,
2959 25:261-267.

2960 THOMPSON, RL, PC ABREU, W WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for
2961 water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203:263-
2962 278.

2963 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
2964 Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission.

2965 UTERMOHL, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton
2966 metthodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnology*, 9:1-38.

2967 ZARZO, D, E CAMPOS, D PRATS, P HERNANDEZ, JA GARCIA. 2014. Microalgae
2968 production for nutriente removal in desalination brines. *Jour. of desal. and water*
2969 *reuse*, 6(2):61-68.

2970 WYK, PV 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture
2971 systems. In: WYK, P. V., *et al.*, (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating*
2972 *Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services
2973 Tallahassee, USA, p. 125-139.

2974 ZHUKOVA, NV & VI KHARLAMENKO. 1999. Sources of essencial fatty acids in the
2975 marine microbial loop. *Aquat. Mic. Ecol.*, 17:153-157.

2976 WEIBEL, ER. 1980. Stereological methods. London Academic. 2:253:257.

2977

2978

2979

2980

CAPÍTULO IV

2981

2982

2983 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE ALIMENTO NO PRÉ-BERÇÁRIO DE

2984

Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931).

2985

2986

2987

Sabrina Medeiros Suita

2988

Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande - FURG

2989

Cx. Postal 474, CEP:96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil

2990

smsuita@yahoo.com.br

2991

2992

2993

2994

2995

2996

2997

2998

2999

3000

3001

3002 **RESUMO**

3003 O objetivo do presente trabalho foi utilizar análise de contribuição de diferentes
3004 fontes de alimento para o crescimento e status nutricional de pós-larvas de *Litopenaeus*
3005 *vannamei* cultivadas em sistema de água clara. Utilizando-se as técnicas de isótopos
3006 estáveis e histologia do hepatopâncreas como ferramentas. O experimento foi conduzido
3007 desde a fase de pós-larva de um dia até trinta dias. As unidades experimentais
3008 continham doze litros de volume útil em um sistema de “*water table*”, para manutenção
3009 da temperatura, com densidade de estocagem de 75 pós-larvas/litro. Os parâmetros
3010 físicos e químicos da água foram monitorados diariamente e nitrito, nitrato e fosfato
3011 semanalmente. Coletas para análise de valores isotópicos $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ das diferentes
3012 fontes alimentares e de pós-larvas foram feitas no último dia experimental. Pós-larvas
3013 de trinta dias também foram coletadas para cortes histológicos do hepatopâncreas.
3014 Durante o período experimental foi detectado a colonização das paredes dos tanques por
3015 um biofilme, o qual foi considerado como fonte de alimento, ao final do estudo as
3016 fontes alimentares, incluindo o biofilme foram coletadas e seus valores isotópicos
3017 comparados com os valores isotópicos de pós-larvas de *L. vannamei* cultivadas nos
3018 diferentes regimes de alimentação. Os tratamentos foram separados em R com oferta de
3019 ração artificial, RAM com oferta de ração, *Artemia* sp. e *C. muelleri*, RM apenas ração
3020 e *C. muelleri* e RA apenas ração e *Artemia* sp. As rações ofertadas foram Flake
3021 (INVE[®]) até o décimo dia experimental, após esta fase, substituída para 40J
3022 (POTIMAR-GUABI[®]). Os resultados apontaram para a importância da adição de fontes
3023 vivas de alimento, como *Artemia* sp. e/ou *C. muelleri* utilizadas em co-alimentação com
3024 a ração, além do uso do biofilme, contribuindo com a boa sobrevivência e crescimento
3025 de pós-larvas de *L. vannamei*. Contudo, a *Artemia* sp. apresentou-se como a fonte viva

3026 mais eficaz para a qualidade nutricional de pós-larvas e seu fornecimento não deve ser
3027 substituído por *C. muelleri* durante a fase de berçário e em meio a água clara.

3028 **Palavras-chave:** *Artemia* sp., Hepatopâncreas, Isótopos estáveis, Microalgas, Pós-
3029 larvas.

3030

3031

3032

3033

3034

3035

3036

3037

3038

3039

3040

3041

3042

3043

3044

3045

3046

3047

3048

3049

3050

3051 **INTRODUÇÃO**

3052 *Litopenaeus vannamei* é a espécie de crustáceo marinho mais cultivada no
3053 mundo e sua rusticidade e facilidade de manejo possibilitaram que tenham se
3054 estabelecido como espécie de maior interesse comercial, tendo em vista à existência de
3055 um pacote tecnológico voltado às exigências específicas desta espécie (FAO 2012).
3056 Ainda assim, a alimentação inadequada, sobretudo nas primeiras fases de vida desta
3057 espécie podem gerar prejuízos para a produção, gerando, inclusive, organismos com
3058 déficit de crescimento e suscetibilidade a doenças, causadas, por exemplo, pela não
3059 realização completa da muda (FAO 2004) e atrofia nos túbulos do hepatopâncreas
3060 (Suita *et al.* 2015, Bell & Lightner 1988).

3061 Embora os alimentos vivos, tais como *Artemia* sp. e microalgas sejam utilizados
3062 em regime de co-alimentação com alimentos inertes e esta seja a maneira mais eficaz
3063 para suprir exigências nutricionais (Gamboa -Delgado & Le Vay 2009). De acordo com
3064 Moss (1994), jovens de *L. vannamei* são capazes de crescer quando cultivados
3065 utilizando apenas microalgas como fonte de alimento. O tipo de alimento ofertado pode
3066 ter influência direta na qualidade do lote de pós-larvas produzidas, isto porque o
3067 hepatopâncreas é um órgão digestivo responsável pela síntese de enzimas,
3068 armazenamento e transporte de lipídeos e minerais (Felgenhauer 1992) e o tamanho e
3069 formação de seus túbulos pode ser um indicativo nutricional para pós-larvas de
3070 camarões (Suita *et al.* 2015), entretanto estes indicadores ainda são pouco conhecidos,
3071 especialmente quando compara-se o efeito que diferentes fontes alimentares podem
3072 gerar sobre tal órgão. Assim, a observação do hepatopâncreas também pode ser usada
3073 para avaliar condição nutricional dos camarões.

3074 A alimentação inadequada, sobretudo nas primeiras fases de vida de *Litopenaeus*
3075 *vannamei* pode gerar prejuízos para a produção, causando deformidades nos túbulos,

3076 ausência de células e menor atividade deste órgão (Suita *et al.* 2015, Bell & Lightner
3077 1988). A técnica tradicionalmente utilizada para se observar o consumo de alimento por
3078 um determinado organismo é a análise de conteúdo estomacal, contudo esta técnica é
3079 dificultada quando se trabalha com organismos pequenos, como é o caso de pós-larvas
3080 (Coman *et al.* 2006).

3081 Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes
3082 fontes de alimento no desempenho zootécnico, qualidade da água, análise dos túbulos
3083 do hepatopâncreas e retenção de nutrientes no tecido de pós-larvas de *Litopenaeus*
3084 *vannamei*.

3085 **MATERIAL E MÉTODOS**

3086 **Obtenção dos animais**

3087 Náuplios de *Litopenaeus vannamei* foram adquiridos na empresa Aquatec
3088 localizada no estado do Rio Grande do Norte, sendo transportados até Rio Grande, Rio
3089 Grande do Sul, onde foram mantidos desde o estágio de Nauplio V até a metamorfose
3090 para pós-larva, no setor de Larvicultura de camarões marinhos da Estação Marinha de
3091 Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande, EMA-FURG. O experimento teve
3092 início com os camarões no estágio de PL₁ (Pós-larva de um dia) e finalizado 30 dias
3093 após, quando atingida a idade de PL₃₀.

3094 **Delineamento experimental**

3095 Neste experimento foram testados quatro tratamentos com três réplicas cada. As
3096 renovações de 80% da água de cada tanque foram realizadas a cada vez que a
3097 concentração limite de amônia (1,0 mg/L) foi alcançada. Esta concentração foi
3098 determinada conforme o nível de segurança estabelecido para pós-larvas do *Litopenaeus*
3099 *vannamei* (1,32 mg/L N-AT) (Cobo *et al.* 2012).

3100 As unidades experimentais utilizadas foram tanques de plástico em formato “U”
3101 com volume utilizado de 12 litros cada. A densidade inicial de estocagem foi de 75
3102 camarões/litro. Os tratamentos foram divididos em regimes diferentes de alimentação,
3103 porém com frequência alimentar idêntica, sendo fornecidas quatro alimentações/dia. Os
3104 tratamentos contendo microalgas como parte do regime alimentar tiveram a adição
3105 inicial da microalga *Chaetoceros muelleri* na proporção de 5×10^4 células/ml, contagens
3106 diárias foram feitas e quando necessário, reposição para manutenção da densidade
3107 inicial. As rações fornecidas durante o presente estudo foram Flake (INVE[®]) da fase de
3108 PL₁ até PL₁₀ e após esta fase 40J (POTIMAR-GUABI[®]), peneirada para obter-se uma
3109 granulometria de 300 µm e fornecida entre as fases de PL10 até PL20 e, após esta fase,
3110 fornecida na granulometria de 500 µm. O manejo alimentar foi adaptado de
3111 recomendações da FAO (2004).

3112 Os tratamentos foram divididos em um tratamento controle (RAM) onde foi
3113 ofertada ração comercial duas vezes ao dia e outras duas alimentações com náuplios
3114 congelados de *Artemia* sp., além da adição de microalgas ao ambiente de cultivo. O
3115 tratamento com utilização de ração e microalgas foi denominado de (RM) no qual foram
3116 ofertados quatro horários de ração comercial e desenvolvido com a presença de
3117 microalgas, sem a adição de *Artemia* sp., um terceiro tratamento denominado com (RA)
3118 teve o regime de alimentação dividido em dois horários com ração e dois com náuplios
3119 congelados de *Artemia* sp., sem a adição das microalgas e o quarto tratamento (R)
3120 desenvolvido sem a adição de alimento natural (*Artemia* sp. ou microalgas) apenas com
3121 a adição de ração comercial quatro vezes ao dia. Em todas as unidades experimentais foi
3122 observada a colonização das paredes dos tanques por um biofilme, este material foi
3123 considerado como fonte de alimento em todos os tratamentos.

3124 Em todos os regimes de alimentação foi realizada aplicação diária de probiótico
3125 (Pro-w/INVE[®]) (1ppm).

3126 **Tratamento da água e Parâmetros Físicos e Químicos**

3127 Foi utilizada água marinha (salinidade 30), previamente filtrada em filtros de 25,
3128 5 e 1 μm , clorada com hipoclorito de sódio a 15 ppm e declorada com ácido ascórbico
3129 (1,0 ppm). Após a mesma foi tratada com EDTA (20 ppm), para evitar presença de
3130 metais pesados. Para manutenção da temperatura da água próxima aos 30°C, os tanques
3131 foram dispostos em uma “*water table*” onde foram utilizados aquecedores com
3132 termostato. A salinidade foi ajustada diariamente para próximo a 30, utilizando água
3133 doce da companhia de abastecimento local, previamente filtrada, tratada (conforme água
3134 marinha) e aquecida. A aeração foi suprida através de pedras porosas.

3135 Diariamente foram realizadas medidas de oxigênio dissolvido com YSI55
3136 oxymeter (Yellow Springs, OH, USA), temperatura (termômetro de mercúrio) e pH
3137 com YSI 100 pH-meter (Yellow Springs, OH, USA). Análise de amônia (N-
3138 $(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)$) foi realizada a cada dois dias (Unesco 1983). Semanalmente foram feitas
3139 medidas de nitrito (N- NO_2^-) (Bendchneider & Robinson 1952), fosfato (P- PO_4^{3-})
3140 (Aminot & Chaussepied 1983). Alcalinidade (mg/ L de CaCO_3) (APHA 1998) e nitrato
3141 (N- NO_3^-) foram determinadas em coleta inicial e final (Aminot & Chaussepied 1983).

3142 **Análises morfométricas do hepatopâncreas**

3143 As análises histológicas foram feitas após a coleta de 10 indivíduos de cada
3144 réplica, fixados em solução Bouin por seis horas e preservados em álcool 70%. Todas as
3145 amostras foram processadas em processador automático 05 LUPE PT e mergulhados em
3146 Paraplast (Sigma). Após, os blocos foram cortados em micrótomo de 5 μm LUPETEC
3147 MRPO3 e corados com hematoxilina-eosina.

3148 Dez pós-larvas de cada tratamento foram usadas para análises morfométricas das
3149 paredes dos túbulos do hepatopâncreas, usando medições em dez tubulos de cada pós-
3150 larva, mensurados usando lentes (Carl Zeiss) em micrometros com 10x de magnificação
3151 (Weibel 1980) usando software Axiovision 4.8. Embora não tenham sido quantificadas
3152 a quantidade de células B na parede dos túbulos do hepatopâncreas, as mesmas foram
3153 comparadas entre os tratamentos quanto a presença ou ausência.

3154 No ultimo dia experimental 50 PL's de cada unidade experimental foram
3155 medidas em comprimento (mm) e pesadas (mg) e os indivíduos remanescentes de cada
3156 unidade experimental foram contados para verificação da sobrevivência média final.

3157 **Análise de isótopos estáveis**

3158 Coletas das diferentes fontes alimentares e pós-larvas de *L. vannamei*, foram
3159 efetuadas e analisadas no último dia experimental para determinar os valores isotópicos
3160 de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$.

3161 As amostras foram mantidas em ultra freezer (Quimis 80v) em temperatura de
3162 25°C negativos e liofilizadas em Liofilizador (Liotop-L101), por aproximadamente 10
3163 horas, no Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas do Instituto de Ciências
3164 Biológicas da FURG. Em seguida, as amostras foram maceradas, pesadas (1,0 mg \pm 0,2
3165 mg) e colocadas em cápsulas de estanho. As análises da razão isotópica de carbono
3166 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foram realizadas no UC Davis Stable Isotope Facility,
3167 CA. Os resultados das análises isotópicas foram quantificados de acordo com a notação
3168 delta:

$$3169 \quad \delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$$

3170 Onde R_{amostra} corresponde à razão entre isótopos pesados e leves da amostra e
3171 $R_{\text{padrão}}$ corresponde à razão entre isótopos pesados e leves do belemnito de Pee Dee e o
3172 ar atmosférico, padrões internacionais para carbono e nitrogênio, respectivamente.

3173 O modelo Bayesiano de misturas de isótopos (SIAR; Parnell *et al.* 2010) foi
3174 utilizado para obter as contribuições relativas das fontes alimentares ao crescimento dos
3175 camarões em períodos diferentes do cultivo.

3176 O fracionamento adotado foi de 0,4‰ para $\Delta^{13}\text{C}$ e 2,7‰ $\Delta^{15}\text{N}$ conforme valores
3177 utilizados anteriormente para pós-larvas de *L. vannamei* por Dittel *et al.* (1997).

3178 **Testes Estatísticos**

3179 Nos dados referentes ao desempenho zootécnico, qualidade da água e qualidade
3180 das pós-larvas foi aplicado teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis
3181 1952).

3182 Com base nos valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ foi estimada a contribuição de
3183 cada fonte alimentar na dieta de *L. vannamei*, através de modelos de mistura com
3184 abordagem bayesiana em R, no pacote SIAR (Parnell *et al.* 2010). Para inferir a
3185 contribuição das diferentes fontes na dieta foram estabelecidos um modelo de mistura
3186 isotópica para cada tratamento (dia 30). Foram usados nos modelos quatro potenciais
3187 itens alimentares (Flake INVE[®]), 40J (POTIMAR GUABI[™]), *Artemia* sp., *C. muelleri*).
3188 Ainda foi considerado como quinta fonte alimentar a presença do biofilme formado
3189 naturalmente em todas as réplicas. O intervalo de contribuição (IC) adotado foi de 95%.

3190 **RESULTADOS**

3191 **Qualidade da água**

3192 Embora as médias das concentrações totais de nitrito no tratamento RM tenham
3193 ficado consideravelmente abaixo das medias totais dos demais tratamentos, nenhuma
3194 das médias dos parâmetros de qualidade de água diferiram estatisticamente entre os
3195 tratamentos. A concentração de amônia tendeu a aumentar similarmente entre os
3196 tratamentos ao longo do tempo. As médias dos parâmetros de qualidade de água e o

3197 total de água (L) utilizada para renovação ao longo dos trinta dias experimentais são
3198 apresentadas na Tabela I.

3199 Tabela I- Valores médios (\pm DP) das variáveis físico-químicas de qualidade de água,
3200 registrados no cultivo de pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei* nos
3201 diferentes tratamentos, onde: R= ração, RAM= ração + *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA=
3202 ração + *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

Parâmetros	R	RAM	RA	RM
O ₂ D (mg/L)	6,46 \pm 0,48	6,62 \pm 0,4	6,3 \pm 0,5	6,3 \pm 0,48
Temperatura (°C)	27,8 \pm 1,78	27,9 \pm 1,72	27,4 \pm 1,27	27,5 \pm 1,58
Salinidade	29,94 \pm 2,8	27,64 \pm 1,63	29,5 \pm 0,93	29,5 \pm 1,59
pH	8,08 \pm 0,17	8,1 \pm 0,15	8,08 \pm 0,16	8,1 \pm 0,15
SST (mg/L)	663,77 \pm 501,15	713,77 \pm 543,83	610,99 \pm 525,47	672,66 \pm 521,9
Alcalinidade (CaCO ₃)	220,38 \pm 17,68	225 \pm 23,57	220,83 \pm 17,68	220,83 \pm 17,68
Amônia (mg/)	1,39 \pm 0,64	1,99 \pm 1	1,59 \pm 0,73	1,35 \pm 1,06
Nitrito (mg/L)	0,84 \pm 1,32	0,98 \pm 1,67	1,17 \pm 2,02	0,19 \pm 0,32
Nitrato (mg/L)	0,11 \pm 0,19	0,23 \pm 0,4	0,11 \pm 0,19	0
Fosfato (mg/L)	0,36 \pm 0,51	0,56 \pm 0,9	0,65 \pm 0,92	0,56 \pm 0,79
3203 Taxa de troca de água (L)	307,2	316,8	316,8	288

3204 **Desempenho zootécnico**

3205 Quanto à avaliação de peso final, estatisticamente não foi detectada diferença
3206 entre os tratamentos. Em relação à sobrevivência o tratamento R teve resultado
3207 estatisticamente menor do que os tratamentos RA e RAM, os quais foram semelhantes
3208 estatisticamente entre si. O tratamento RM não apresentou medias de sobrevivência
3209 estatisticamente diferentes de nenhum dos tratamentos testados. Os resultados de
3210 desempenho produtivo estão apresentados na Tabela II.

3211 Tabela II- Valores médios (\pm DP) dos parâmetros de desempenho zootécnico registrados
3212 no cultivo de pós-larvas do camarão-branco *Litopenaeus vannamei* nos diferentes
3213 tratamentos, onde: R= ração, RAM= ração + *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração +
3214 *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

Parâmetros	R	RAM	RA	RM
Tamanho inicial (mm)	5±0,5	5±0,5	5±0,5	5±0,5
Peso Inicial (mg)	0,51±0,4	0,51±0,4	0,51±0,4	0,51±0,4
Tamanho Final (mm)	17,67±0,73	18,81±3,15	18,33±1,37	18,1±0,92
Peso Final (mg)	20±8	30±18	30±5	30±9
Sobrevivência (%)	54,11±4,58 ^b	90±6,81 ^a	76,94±11,72 ^{ac}	67,66±9,3 ^{bc}
Biomassa final (g)	5,29±2,45 ^a	16,87±7,57 ^b	15,6±0,58 ^b	13,2±2,2 ^b

3215

3216

Análises Histológicas

3217

3218

3219

3220

3221

3222

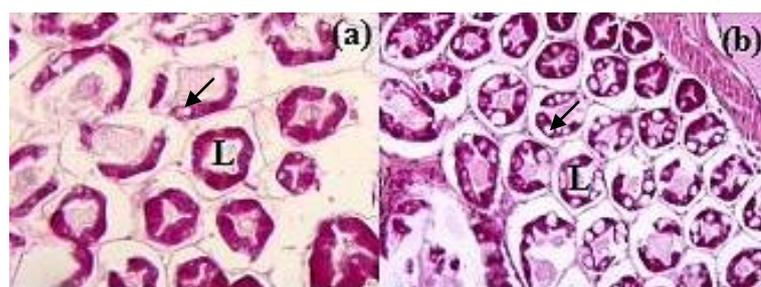
3223

3224

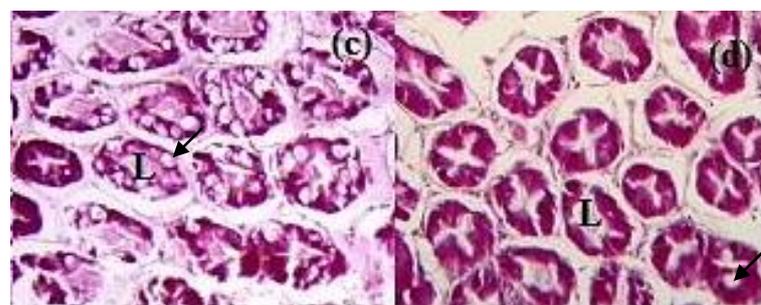
3225

A espessura das paredes dos túbulos do hepatopâncreas de pós-larvas no tratamento R foi menor do que os demais, porém não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos. As paredes dos túbulos no tratamento RM, também apresentaram formato menos definido que os demais. Além disto, embora não tenha sido quantificada a presença de células nas paredes dos túbulos do hepatopâncreas, os tratamentos R e RM apresentaram uma menor quantidade aparente de células, sobretudo células B, quando comparado aos demais tratamentos. Na Figura 1 (a, b, c e d) são mostradas imagens fotográficas dos túbulos nos diferentes tratamentos (escala=100µm). Os resultados morfométricos são apresentados na Figura 2.

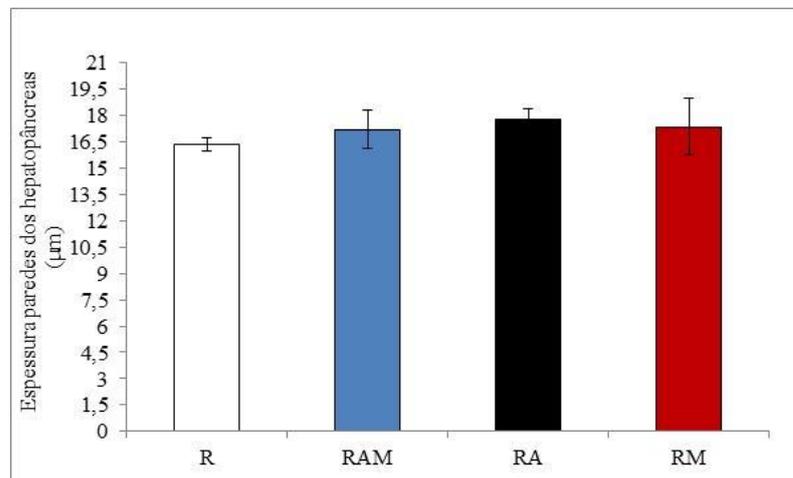
3226



3227



3228 Figura 1- Cortes transversais do hepatopâncreas ressaltando a formação dos túbulos em
3229 pós-larvas de *L. vannamei*, com magnificação de 100x, nos diferentes tratamentos onde:
3230 R= ração (a), RAM= ração + *C. muelleri* + *Artemia* sp. (b), RA= ração + *Artemia* sp. (c)
3231 e RM= ração + *C. muelleri* (d).



3232

3233 Figura 2- Espessura das paredes dos túbulos do hepatopâncreas (µm) (Média ± DP) de
3234 pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* nos tratamentos nos tratamentos R= ração, RAM=
3235 ração + *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração + *Artemia* sp. e RM= ração + *C. muelleri*.

3236 Isótopos Estáveis

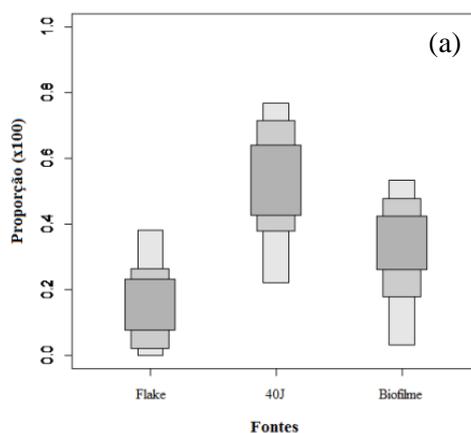
3237 Com relação às fontes de alimento natural, o tratamento RAM apresentou o IC
3238 da fonte *Artemia* sp. semelhante ao tratamento RA (IC= 0-31% e IC= 0-38%,
3239 respectivamente), o mesmo ocorreu em relação a microalga *C. muelleri* para os
3240 tratamentos RAM e RM (IC= 0-35% e IC=0-33%, respectivamente). A presença do
3241 biofilme nos tanques de cultivo teve maior IC no tratamento RAM (IC= 5-67%). Com
3242 relação a oferta de rações, verificou-se que Flake (INVE[®]) teve IC mais expressivo no
3243 tratamento RA (IC= 0-50%), já a ração 40J (POTIMAR-GUABI[®]) teve maior expressão
3244 nos tratamentos R e RM (IC= 18-74% e 11-79%, respectivamente).

3245 Na Tabela III é apresentado o intervalo de contribuição de cada fonte alimentar
 3246 para cada tratamento. A proporção de contribuição de cada fonte nos diferentes
 3247 tratamentos é apresentada na Figura 3 (a,b,c e d).

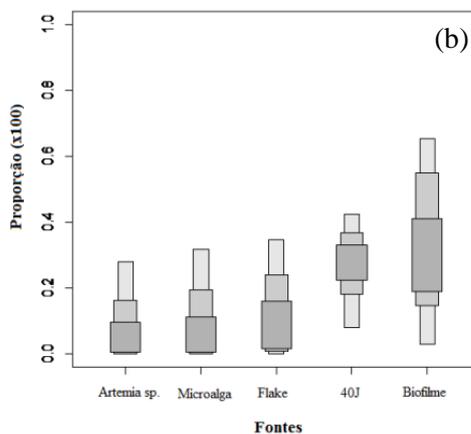
3248 Tabela III. Intervalo de contribuição (IC) das diferentes fontes alimentares ao longo do
 3249 cultivo do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, nos diferentes tratamentos, onde: R=
 3250 ração, RAM= ração + *C. muelleri* + *Artemia* sp., RA= ração + *Artemia* sp. e RM= ração
 3251 + *C. muelleri*.

Tratamentos	<i>Artemia</i> sp.	<i>C. muelleri</i>	Flake	40J	Biofilme
R	N.O	N.O	1-43%	18-74%	5-55%
RA	0-38%	N.O	0-50%	4-43%	13-47%
RM	N.O	0-33%	0-41%	11-79%	2-50%
RAM	0-31%	0-35%	0-38%	6-41%	5-67%

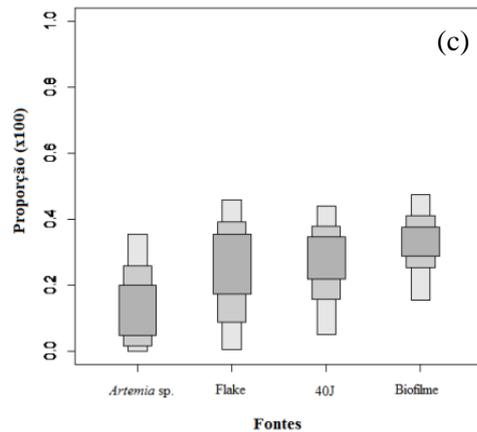
3253 *N.O. Não ofertado como fonte de alimento.



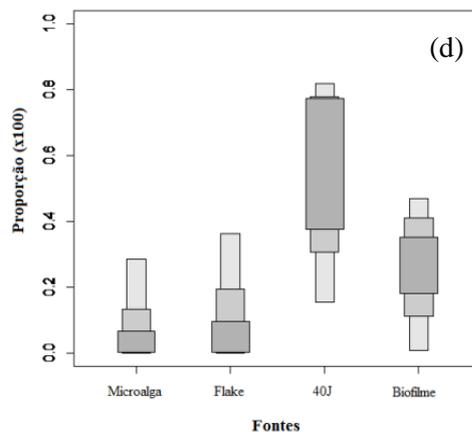
3254



3255



3256



3257

3258 Figura 3- Valores médios (Proporção x 100%) da contribuição das diferentes fontes
 3259 alimentares fornecidas no cultivo de pós-larvas camarão-branco *Litopenaeus vannamei*,
 3260 nos diferentes tratamentos, onde: R= ração (a), RAM= ração + *C. muelleri* + *Artemia*
 3261 sp. (b), RA= ração + *Artemia* sp. (c) e RM= ração + *C. muelleri* (d).

3262 DISCUSSÃO

3263 Em camarões peneídeos os primeiros dias como pós-larva são denominados
 3264 como período crítico, pois é neste momento que há completa diferenciação do sistema
 3265 digestivo (Lovett & Felder 1989), estas mudanças morfológicas demandam que ocorram
 3266 modificações na composição da dieta ofertada a fim de suprir todas as exigências
 3267 nutricionais para este período (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009). O regime alimentar
 3268 ofertado nas fases iniciais de vida de camarões peneídeos é baseado na combinação de

3269 alimentos vivos e ração artificial, utilizando-se a ração em regime de co-alimentação
3270 com microalgas e *Artemia* sp. (Brito *et al.* 2000).

3271 Para camarões, a exigência proteica pode variar conforme a fase de vida, para
3272 pós-larvas esta exigência varia entre 30-45% e uma dieta formulada com apenas um
3273 ingrediente não é capaz de suprir todas as necessidades nutricionais da espécie (Wyk
3274 1999), sendo considerada ótima quando seus teores de proteína, lipídeos e carboidratos
3275 estão balanceados (Barros & Valenti 2003). Para suprir estas necessidades, alimentos
3276 vivos, tais como *Artemia* sp. e microalgas são empregados em regime de co-
3277 alimentação com ração inerte como protocolo de alimentação nas fases iniciais de vida
3278 de *L.vannamei*. Porém a decomposição destes organismos no ambiente de cultivo,
3279 devido a mortalidade ou quando não consumidos, tal como a ração, podem gerar alta
3280 carga orgânica e diminuir a qualidade da água, exigindo que sejam efetuadas
3281 renovações de água, as quais podem chegar a 100 % ao dia (FAO 2004).

3282 As renovações constantes de água podem representar custos econômicos e
3283 ambientais com captação e tratamento de água, possibilidade de introdução ou
3284 disseminação de patógenos e ainda desperdício de alimento (Boyd 2003). A produção
3285 de alimentos vivos também demanda os custos elevados para produção, de maneira que
3286 a substituição ou diminuição da adição de fontes de alimento vivo pode proporcionar
3287 mais economia (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009).

3288 No presente estudo, o biofilme colonizou naturalmente as paredes das unidades
3289 experimentais. Alguns trabalhos citam o biofilme como benéfico para a produção de
3290 peneídeos, uma vez que podem melhorar a qualidade da água e crescimento de *F.*
3291 *paulensis* (Thompson *et al.* 2002), *Farfantepenaeus brasiliensis* (Viau *et al.* 2013) e *L.*
3292 *vannamei* (Moss & Moss 2004) e, ainda, aumentar a nitrificação nos tanques de
3293 produção aquícola (Bratvold & Browdy 2001), contudo esta colonização não foi

3294 suficiente para controlar a concentração de amônia que aumentou ao longo do tempo em
3295 todos os tratamentos, atingindo concentrações acima de 1,32 mg/L (limite de segurança
3296 sugerido por Cobo *et al.* 2012), mesmo com renovações diárias de água de
3297 aproximadamente 80% do volume de cada unidade experimental.

3298 Abreu *et al.* (2007) também citam que o biofilme é uma substancial fonte de
3299 carbono e nitrogênio para juvenis de *F. paulensis*. Além disto, as bactérias presentes no
3300 biofilme são aptas a produzir antibióticos que previnem o aparecimento das bacterias
3301 patogênicas (Austin & Day 1990) da mesma forma que os protozoários (Thompson *et*
3302 *al.* 1999), podendo gerar organismos mais saudáveis, além de reduzir os gastos com
3303 troca de água (Thompson *et al.* 2002, Viau *et al.* 2013). No presente trabalho, pelo fato
3304 de terem sido feitas observações constantes de pós-larvas predando em cima deste
3305 substrato, tal material foi considerado como fonte de alimento e comparado as demais
3306 fontes, o mesmo comportamento foi observado por Ballester *et al.* (2007) com pós-
3307 larvas de *Farfantepenaeus paulensis*, as quais foram observadas constantemente
3308 predando sobre o biofilme formado com uso de substratos artificiais.

3309 De acordo com Burford *et al.* (2004), o biofilme contribuiu substancialmente
3310 (IC=39-53%) para os requerimentos de carbono e o nirogênio sendo assimilado pelas
3311 pós-larvas de *Penaeus esculentus* (Haswell). A melhora no desempenho de pós-larvas
3312 de peneideos produzidas com o uso de biofilme se dá devido fato de que a presença dos
3313 microrganismos presentes neste meio são um importante incremento nutricional para
3314 pós-larvas, podendo servir como fonte extra de alimento (Burford *et al.* 2004, Ballester
3315 *et al.* 2007) .

3316 A adição *Artemia* sp., microalgas e ração representam um protocolo ideal de
3317 alimentação para fases iniciais de vida de camarões. A *Artemia* sp. é um alimento
3318 imprescindível (FAO 2004), por ser fonte de nutrientes essenciais para organismos

3319 marinhos, por apresentar alta digestibilidade e estabilidade na coluna d'água (Léger *et*
3320 *al.* 1986). Porém, problemas com seu uso estão relacionados com a pouca
3321 disponibilidade de produção de cistos (Sorgeloos *et al.* 2001), alto custo de produção
3322 (Lavens *et al.* 2000) e possibilidade de transmissão de doenças (Southgate & Partridge
3323 1998, Naylor *et al.* 2009).

3324 Por outro lado, as microalgas são amplamente utilizadas em larviculturas e
3325 berçários pois, além de manter a qualidade da água em condições adequadas, são um
3326 ótimo alimento por ter alto valor nutricional e capacidade de sintetizar e acumular
3327 ácidos graxos (PUFAS) (Brown *et al.* 1997). Contudo, em sistemas de produção em
3328 meio à água clara há a necessidade de adição constante de microalgas a cada renovação
3329 de água, tornando o sistema dependente de uma produção constante de biomassa algal
3330 (FAO 2004). Porém, ainda que a adição de microalgas seja importante, dietas com
3331 apenas uma fonte de alimento podem não produzir organismos de qualidade, uma vez
3332 que as dietas precisam ser fornecidas de maneira balanceada, de modo que possam
3333 suprir todas as necessidades nutricionais da espécie cultivada (Brito *et al.* 2000).
3334 Soares *et al.* (2006) citam que a habilidade de pós-larvas de *Farfantepenaeus paulensis*
3335 sobreviver quando alimentadas apenas com dieta monoalgal se restringe a poucos dias e
3336 mesmo em conjunto com dieta artificial, não interfere no aumento de crescimento, em
3337 contrapartida, a *Artemia* sp. administrada sozinha possui a capacidade de suprir as
3338 exigências desta espécie.

3339 No presente estudo, a importância da adição do alimento vivo até os trinta dias
3340 como pós-larva ficou evidente no tratamento R, o qual foi mais afetado em relação a
3341 sobrevivência e peso final e biomassa final, corroborando com dados obtidos por
3342 Gamboa-Delgado & Le Vay (2009) os quais recomendam que para *L. vannamei* nas
3343 fases iniciais de vida o regime de co-alimentação entre dieta inerte e *Artemia* sp. seja a

3344 maneira mais eficaz para se obter um bom desempenho. Da mesma forma, embora no
3345 tratamento RM tenha havido um crescimento compatível com os demais tratamentos
3346 (RA e RAM), as médias de sobrevivência não avançaram a taxa 70%, consideradas
3347 como ótima pela FAO (2004).

3348 Nos tratamentos R e RM, a ração 40J apresentou alto intervalo de contribuição
3349 (IC= 18-74 e 11-79%, respectivamente), embora o IC do biofilme também tenha sido
3350 expressivo para ambos os tratamentos. Isto pode indicar que em sistemas de água clara a
3351 falta da adição de uma fonte viva de alimento, em especial a *Artemia* sp. possa trazer
3352 prejuízos para o desempenho das pós-larvas, fazendo com que estas busquem fontes de
3353 alimento natural além da microalga *C. muelleri*, neste caso, os microrganismos do
3354 biofilme.

3355 Os baixos índices de sobrevivência registrados no tratamento R corroboram com
3356 as análises histológicas do hepatopâncreas das pós-larvas, mostrando que indivíduos
3357 desta idade, alimentados sem a adição de uma fonte de alimento natural, são afetados
3358 negativamente pela ausência desta fonte, de maneira que os túbulos do hepatopâncreas
3359 se apresentam mais finos e quase totalmente ausentes de células B. No tratamento RM,
3360 a menor quantidade aparente de células B também foi detectada. As células B estão
3361 envolvidas com a digestão intracelular e quando ocorrem em grande quantidade são
3362 indicativos de atividade digestiva e a caracterização histológica destas células pode ser
3363 utilizada para indicar a condição de sanidade ou stress de um animal (Marcolin *et al.*
3364 2008). As células B são caracterizadas por um grande vacúolo e com a digestão ficam
3365 mais ativas para processar nutrientes, os quais e após assimilados extravazam o material
3366 para o lúmen (Al-Mohana & Nott 1989), no tratamento R também foi observada pouca
3367 quantidade de material armazenado no lúmen, sendo uma comprovação de baixa
3368 atividade do hepatopâncreas.

3369 Nos tratamentos RAM e RA, os quais tiveram a adição de *Artemia* sp.,
3370 verificou-se que na presença deste alimento, o IC de todas as fontes foi mais equilibrado
3371 e a contribuição da ração inerte não foi tão expressiva como nos demais tratamentos.
3372 Além disto, os melhores resultados de desempenho das pós-larvas, como sobrevivência
3373 e biomassa foram detectados nestes dois tratamentos. Estes resultados concordam com
3374 dados de Brito *et al.* (2000) os quais citam que o uso de *Artemia* e microalgas como
3375 fonte de alimento contribui para o aumento da digestibilidade e melhora a qualidade da
3376 dieta para pós-larvas de *Litopenaeus setiferus* e, quando a ração é fornecida sem uma
3377 fonte de alimento natural as taxas de crescimento diminuem consideravelmente.
3378 Previamente Jones *et al.* (1987) também citaram que o uso de microalgas, *Artemia* sp. e
3379 ração inerte fornecidas em regime de co-alimentação para fases iniciais de vida de
3380 crustáceos, melhoram o desempenho, recomendam que a ração não seja fornecida
3381 isoladamente, uma vez que não é capaz de fornecer nutrientes na forma próxima ao que
3382 seria disponibilizado no ambiente natural.

3383 Estudos previos feitos com diferentes regimes de co-alimentação para pós-larvas
3384 de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos, sugerem que na presença dos microrganismos
3385 colonizadores dos bioflocos, é possível haver uma substituição da *Artemia* sp. pelas
3386 microalgas, uma vez que pela suspensão das renovações de água as microalgas
3387 inoculadas conseguem crescer e se manter no ambiente, melhorando a qualidade da
3388 água e sendo utilizadas como alimento pelas pós-larvas (Suita, Capítulo IV), contudo,
3389 no presente estudo observou-se que em sistemas de água clara, as pós-larvas embora
3390 consumam e assimilem as microalgas e os microrganismos do biofilme, as mesmas
3391 ainda são dependentes da adição das três fontes de alimento em conjunto para um bom
3392 desempenho, e a exclusão da *Artemia* sp. pode trazer prejuízos a produção. Além disto,
3393 indivíduos alimentados apenas com ração, embora tenham consumido o alimento

3394 natural proveniente do biofilme, não apresentam bons resultados quanto a espessura dos
3395 túbulos do heptopâncreas e presença de células B, indicando baixa qualidade nutricional
3396 e baixa atividade digestiva.

3397 **CONCLUSÕES**

3398 A adição de fontes de alimento vivo como *Artemia* sp. e microalga ainda é
3399 imprescindível para a qualidade nutricional de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, e a
3400 ausência destas fontes, resultam em déficit considerável de crescimento, ganho de peso
3401 e sobrevivência em sistemas de produção em meio a água clara. A microalga *C.*
3402 *muelleri* contribuiu de maneira semelhante a *Artemia* sp. para o crescimento das pós-
3403 larvas, contudo observa-se uma qualidade do hepatopâncreas inferior aos tratamentos
3404 RAM e RA, o que indica que esta fonte de alimento gere pós-larvas com uma qualidade
3405 nutricional menor do que quando a *Artemia* sp. é fornecida. Além disto, quando a
3406 *Artemia* sp. é utilizada a importância da ração tende a diminuir, indicando que a adição
3407 de ração pode ser diminuída com o uso desta fonte.

3408 Em sistemas de produção de pós-larvas em meio a água clara, a *Artemia* sp.
3409 apresenta-se como uma fonte essencial para a qualidade nutricional de pós-larvas de *L.*
3410 *vannamei* e não deve ser descartada, nem substituída por *C. muelleri*.

3411 O consumo do biofilme contribuiu para o crescimento dos camarões, indicando
3412 que, mesmo em sistemas de água clara, pós-larvas de *L. vannamei*, buscam alguma
3413 fonte de alimento natural disponível.

3414 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

3415 ABREU, PC, ELC BALLESTER, C ODEBRECHT, WJr WASIELESKY, RO
3416 CAVALLI, G WILHELM, & AM ANESIO. 2007. Importance of biofilm as food
3417 source for shrimp (*farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes $\delta^{13}\text{C}$ e
3418 $\delta^{15}\text{N}$. *Jour. of Exp. Mar.Biol.and Ecol.*, 347:88-96.

- 3419 AL-MOHANNA, SY & JA NOTT. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of
3420 *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biol.*,
3421 101: 535-544.
- 3422 AMINOT A, CHAUSSEPIED M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu
3423 marin. CNEXO, Brest.
- 3424 AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC, 16ed. Patricia Cunniff (ed),
3425 Washington, DC.
- 3426 APHA (American Public Health Association). 1998. Standard methods for the
3427 examination of water and wastewater (20th edn), Washington, DC.
- 3428 AUSTIN, B & JG DAY. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. By a
3429 commercial spray-dried preparation of *Tetrasselmis suecica*. *Aquaculture*, 90:389-
3430 392.
- 3431 BARROS, HP & WC VALENTI. 2003. Ingestion rates of *Artemia* nauplii of different
3432 larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 217:223-233.
- 3433 BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI & PC ABREU. 2007. Nursery
3434 of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates:
3435 Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269:355-362.
- 3436 BELL, TA & D LIGHTNER. 1988. Manual de Histología del camarón Penaeido
3437 normal. *World Aquac. Soc.*, Baton Rouge, USA.
- 3438 BENDSCHNEIDER K & RJ ROBINSON. 1952. A new spectrophotometric method for
3439 the determination of nitrite in sea water. *J Mar Res.* 11:87-96.
- 3440 BROWN, MR, SW JEFFREY, JK VOLKMAN & GA DUNSTAN. 1997. Nutritional
3441 properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151:315-331.

3442 BRATVOLD, D & CL BROWDY. 2001. Effects of sand sediment and vertical
3443 surfaces (AqaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an
3444 intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195:81-94.

3445 BOYD, CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm- level.
3446 *Aquaculture*, 226: 101-112.

3447 BRITO, R, ME CHIMAL, G GAXIOLA & C ROSAS. 2000. Growth, metabolic rate,
3448 and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early
3449 postlarvae fed different diets. *Jour. of Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 255:21-36.

3450 BURFORD, MA, MJ SELLARS, SJ ARNOLD, SJ KEYS, PJ CROCOS & NP
3451 PRESTON. 2004. Contribution of the natural biota associated with substrates to the
3452 nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaes esculentus* (Haswell), in
3453 high-density rearing systems. *Aquac. Res.*, 35:508–515.

3454 COBO, M de L, S SONNENHOLZNER, M WILLE & P SORGELOOS. 2012.
3455 Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture*
3456 *Research*, 1-6.

3457 COMAN, FE, RM CONNOLLY, SE BUNN & NP PRESTON. 2006. Food sources of
3458 the sergestid crustacean, *Acetes sibogae*, in shrimp ponds. *Aquaculture*, 259:222-
3459 233.

3460 DITTEL, AL, CE EPIFANIO, LA CIFUENTES & DL KIRCHMAN. 1997. Carbon e
3461 Nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove
3462 system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 45: 629-637.

3463 FAO.2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de
3464 postlarvas de camarón (*Penaes vannamei*) em America Latina. Roma: Documento
3465 Tecnico de Pesca. 450p.

3466 FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma SOFIA, p.24-26.

3467 FELGENHAUER, B.1992.Internal anatomy of the decapoda: On overview. In:
3468 Microscopic Anatomy of Invertebrates, 10:45-75.

3469 GAMBOA-DELGADO, J & L LE VAY. 2009. Artemia replacement in co-feeding
3470 regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional
3471 contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon by stable
3472 isotopes. *Aquaculture*, 297:128-135.

3473 JONES, DA, M KUMLU, L LE VAY & DJ FLETCHER. 1987. The digestive
3474 physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a
3475 review. *Aquaculture*, 155:285-295.

3476 KRUSKAL, WH & ALLEN WALLIS. 1952. Kruskal-Wallis one way analysis of
3477 variance. *Jour. of the Amer. Stat. Assoc.*, 47 (260):583-621.

3478 LÉGER, P, DA BENGSTON, KL SIMPSON & P SORGELOOS. 1986. The use and
3479 nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*,
3480 24:521-623.

3481 LAVENS, P. & SORGELOOS, P. 2000. The history, present status and prospects of the
3482 availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181: 397-403

3483 LOVETT, DL & DL FELDER. 1989. Ontogeny of gut morphology in the White shrimp
3484 *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Jour. of Morphol.*, 201:253-272.

3485 MARCOLIN, C da R, CRG CARQUEIJA, S de O TOZETTO, DV OLIVEIRA &
3486 AMA CÔRREA. 2008. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides*
3487 *cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos
3488 estádios de intermuda e pré-muda inicial. *Rev. Brasil. de Zooc.*, 10(2): 97-104.

3489 MOSS, SM. 1994. Growth rates, nucleic acid concentrations, and RNA/DNA ratios of
3490 juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, fed different algal diets. *Jour. of*
3491 *Exp. Mar.Biol.and Ecol.*, 182:191-204.

3492 MOSS, KRK & SM MOSS. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on
3493 the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Jour. of*
3494 *World Aquac. Soc.*, 35(4):536-542.

3495 NAYLOR, RL, RW HARDY, DP BUREAU, A CHIUA, M ELLIOT, AP FARRELL, I
3496 FORSTER, DM GATLIN, RJ GOLDBURG, K HUA & PD NICHOLS. 2009.
3497 Feeding aquaculture in an era of finite resource. Proceedings of the National
3498 Academy of Sciences of the United States America (PNAS), 106(42): 36p.

3499 PARNELL, A, R INGER, S BEARHOP & AL JACKSON. 2010. Source partitioning
3500 using stable isotopes: coping with too much variation. *PlosOne*, 5 (3).

3501 STRICKLAND, JDH & TR PARSONS.1972. A practical handbook of seawater
3502 analysis. Fisheries Research Board of Canada. 2. ed. Ottawa: Bulletin 167. 311p.

3503 SUITA, SM, LA ROMANO, AP CARDOZO, PC ABREU & W WASIELESKY.
3504 2015b. Development of the hepatopancreas and quality analysis of post-larvae
3505 Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. *Aquac.*
3506 *Intern.*, 23:449-463.

3507 SOARES, RB, S PEIXOTO, W WASIELESKY & F D`INCAO. 2006. Effect of
3508 different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis*
3509 postlarvae. *Aquac. Res.*, 37:1413-1418.

3510 SORGELOOS, P, P DHERT & P CANDREV. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia*
3511 spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200:147-159.

3512 SOUTHGATE, PC & GJ PARTRIDGE. 1998. Development of artificial diets for
3513 marine finfish larvae: problems and prospects. *In: de Silva, SS (Ed), Tropical*
3514 *Mariculture*. Academic Press, London, UK, pp. 151-170.

3515 THOMPSON, FL, PC ABREU & RO CAVALLI. 1999. The use of microorganisms for
3516 water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-
3517 278.

3518 THOMPSON, RL, PC ABREU & W WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for
3519 water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203:263-
3520 278.

3521 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
3522 Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission.

3523 VIAU, VE, DM SOUZA, EM RODRÍGUEZ, W WASIELESKY JR, PC ABREU &
3524 ELC BALLESTER. 2013. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp
3525 *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaidae). *Aquacult Res* 44:783–794.

3526 WYK, PV. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture
3527 systems. In: WYK, P. V., et al., (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating*
3528 *Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services
3529 Tallahassee, USA, pp. 125-139.

3530 WEIBEL, ER. 1980. *Stereological methods*. London Academic. 2:253:257.

3531

3532

3533

3534

3535

3536

3537

3538

3539

3540 **DISCUSSÃO GERAL**

3541 Na produção de larvas e pós-larvas de camarões marinhos o estado fisiológico,
3542 no qual os animais se encontram ao deixar o ambiente de larvicultura e berçário, está
3543 relacionado com o sucesso da engorda (Barbieri Jr. & Ostrensky Neto 2001, FAO
3544 2004). Desta forma, oferecer um meio ambiente adequado, com boas instalações,
3545 biossegurança, utilizando a água e seus produtos de tratamento de maneira responsável,
3546 garantindo um estado sanitário adequado, e realização de avaliações periódicas da
3547 qualidade de larvas e pós-larvas, fazem parte dos pré-requisitos necessários para uma
3548 produção de qualidade (FAO 2004).

3549 A baixa qualidade da água e a alimentação inadequada durante as primeiras
3550 fases de vida podem trazer prejuízos que serão refletidos ao longo da produção, tais
3551 como a dificuldade de realizar a muda, retardando o crescimento, redução de
3552 sobrevivência, aumento de stress e suscetibilidade a doenças, canibalismo, aumento de
3553 “*fouling*” epibionte sobre carapaça e brânquias, entre outros (FAO 2004). Em sistemas
3554 de bioflocos há a redução das taxas de renovação de água, permitindo que haja a
3555 formação de uma biota natural no ambiente de cultivo (Avnimelech 1999), a qual pode
3556 ser consumida por *L. vannamei*, contribuindo com o seu crescimento na fase adulta
3557 (Burford *et al.*, 2004), apesar disto, os efeitos da redução de renovações de água para
3558 organismos jovens ainda eram pouco conhecidos até o momento.

3559 Na presente tese, em todos os experimentos apresentados foi possível verificar
3560 que a suspensão das renovações de água, seguida pela formação de bioflocos após a fase
3561 de PL₁, garante a produção de organismos com um ótimo desempenho de crescimento,
3562 sobrevivência e qualidade, confirmando que a produção de camarões, desde o primeiro
3563 dia como pós-larva, feita em meio à bioflocos pode ser mais vantajosa, quando
3564 comparados a sistemas convencionais de produção, uma vez que oferece uma produção

3565 com maior biossegurança e menor impacto ambiental, possibilitando a disponibilidade
3566 de alimento durante 24 horas ao dia (Browdy *et al.*, 2001).

3567 A condição nutricional dos organismos pode ser avaliada pela aparência
3568 histológica dos túbulos hepatopancreáticos, pois tais observações, mediante medição de
3569 espessura e presença de células podem indicar a atividade funcional do hepatopâncreas
3570 (Bell & Lightner, 1988), a qual pode ser regulada de acordo com o ambiente no qual os
3571 organismos são produzidos (Moss *et al.*, 2001).

3572 Apesar do conhecimento sobre a importância da alimentação natural para
3573 camarões marinhos, estudos apropriados para descrever a influência deste tipo de
3574 alimento para as fases iniciais de vida (PL₁ até PL₃₀) ainda são escassos. Alguns estudos
3575 de hábito alimentar restringem-se à análises de conteúdo estomacal, técnica com pouca
3576 precisão, uma vez que, devido a trituração do alimento pela passagem no trato
3577 digestório, há uma dificuldade de identificação de presas, além do que permite a
3578 identificação apenas do que foi ingerido momentos antes da coleta e não assimilado e
3579 utilizado para crescimento (Schwamborn and Criales 2000). A técnica de isótopos
3580 estáveis pode ser aplicada para complementar as técnicas convencionais de análise de
3581 consumo alimentar, uma vez que, em associação com modelos matemáticos, permite
3582 identificar a contribuição que cada fonte de alimento teve para o crescimento de um
3583 determinado organismo (Peterson & Fry 1987).

3584 Sabe-se que a *Artemia* sp. é um alimento imprescindível nas fases iniciais de
3585 vida de camarões marinhos (FAO 2004), por ser fonte de nutrientes essenciais para
3586 organismos marinhos e por apresentar alta digestibilidade e estabilidade na coluna
3587 d'água (Léger *et al.* 1986). Contudo os resultados obtidos por análise de isótopos
3588 estáveis, na presente tese, nos permitiram verificar que embora em sistemas de água
3589 clara a *Artemia* sp. ainda apresenta-se como a fonte viva mais eficaz para a qualidade

3590 nutricional de pós-larvas, em sistemas de bioflocos, A *Artemia* sp. apresentou uma
3591 menor contribuição como fonte de alimento do que outras fontes ofertadas, podendo ser
3592 substituída sem prejuízos pela microalga *Chaetoceros muelleri*.

3593 Conforme houve um avanço ontogenético das pós-larvas, houve também, a
3594 maior contribuição dos diferentes tipos de ração para berçário no crescimento dos
3595 organismos. Porém, nos capítulos III e IV da presente tese pode-se confirmar a
3596 importância da adição do alimento vivo até os trinta dias como pós-larva já que os
3597 resultados obtidos nos tratamentos sem adição deste tipo de fonte, foram afetados em
3598 relação a sobrevivência, peso final e biomassa final, corroborando com dados obtidos
3599 por Gamboa-Delgado & Le Vay (2009) os quais citam que para *L. vannamei* nas fases
3600 iniciais de vida o regime de co-alimentação entre dieta inerte e *Artemia* sp. seja a
3601 maneira mais eficaz para se obter um bom desempenho.

3602 As diversas ferramentas de análise utilizadas na presente tese evidenciaram a
3603 importância das fontes vivas de alimento como *Artemia* sp., *C. muelleri*, microbiota do
3604 biofilme e bioflocos, para um bom desempenho e boa condição nutricional de pós-
3605 larvas de *L. vannamei*. Além disto, o efeito do ambiente de cultivo em meio a bioflocos
3606 não garantiu benefícios apenas relacionados à condição nutricional, mas, também,
3607 proporcionou lotes de pós-larvas com excelente qualidade, cumprindo os requisitos de
3608 avaliação necessários para esta fase de vida (FAO 2004), finalizando a etapa de berçário
3609 em condições adequadas para o sucesso no ambiente de engorda.

3610 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

3611 AVNIMELECH, Y. 1999. C/N ratio as a control element in aquaculture systems.
3612 *Aquaculture*, 176: 227-235.

3613 BARBIERI Jr., RC & A OSTRENSKY NETO. 2001. Camarões Marinhos:
3614 Reprodução, Maturação e Larvicultura. Viçosa: Aprenda Fácil ed. 255p.

3615 BELL, TA & D LIGHTNER. 1988. Manual de Histología del camarón *Penaeus*
3616 normal. *The W. Aquac. Soc.*, Baton Rouge, USA.

3617 BROWDY, CL, D BRATVOLD, AD STOKES & RP MCINTOSH. 2001. Perspectives
3618 on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy CL & Jory DE
3619 (eds.). The new wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp
3620 Culture. *The W. Aquac. Soc.*, Baton Rouge, USA, pp. 20-34.

3621 BURFORD, MA, PJ THOMPSON, RC MCINTOSH, RH BAUMAN & DC
3622 PEARSON. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus*
3623 *vannamei*) nutrition in a high-intensity zero-exchange system. *Aquaculture*,
3624 232:525-537.

3625 FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratórios de
3626 postlarvas de camarón (*Penaeus vannamei*) em America Latina. Roma: Documento
3627 Técnico de Pesca, 450p.

3628 GAMBOA-DELGADO, J & L LE VAY. 2009. Artemia replacement in co-feeding
3629 regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional
3630 contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon by stable
3631 isotopes. *Aquaculture*, 297:128-135.

3632 LÉGER, P, DA BENGSTON, KL SIMPSON & P SORGELOOS. 1986. The use and
3633 nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*,
3634 24:521-623.

3635 MOSS, SM, S DIVAKARAN, & BG KIM. 2001. Stimulating effects of pond water on
3636 digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*
3637 (Boone). *Aquac. Res.*, 32:125-131.

3638 PETERSON, BJ & B FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Eco.*
3639 *Syst.*, 18, 293-320.
3640 SCHWAMBORN, R & MM CRIALES. 2000. Feeding strategy and daily diet of
3641 juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*) in South Florida seagrass bed.
3642 *Marine Biology*, 137:139-147.

3643

3644

3645

3646

3647

3648

3649

3650

3651

3652

3653

3654

3655

3656

3657

3658

3659

3660

3661

3662 **CONCLUSÕES GERAIS**

3663 A suspensão das renovações de água pode ser benéfica para pós-larvas de
3664 *Litopenaeus vannamei* desde a fase de PL₁. Os bioflocos são consumidos e assimilados
3665 pelas pós-larvas, melhorando a qualidade nutricional, os índices de desempenho
3666 zootécnico e a qualidade das pós-larvas, além de melhorar a qualidade da água.

3667 Em sistemas de bioflocos a substituição da *Artemia* sp. pela microalga *C.*
3668 *muelleri* é vantajosa, uma vez que a fertilização orgânica com dextrose, quando
3669 comparada a outras fontes de carbono, como o melaço, por exemplo, permite uma
3670 maior penetração de luz no ambiente favorecendo a permanência das microalgas no
3671 ambiente de cultivo por mais tempo, mesmo com o aumento dos sólidos em suspensão.
3672 Desta forma, neste tipo de sistema a suspensão das renovações de água favorece o
3673 crescimento e permanência das microalgas no ambiente, sem necessidade de
3674 inoculações sucessivas.

3675 A substituição da *Artemia* sp. é vantajosa por esta ser uma fonte alimentar de
3676 alto custo e possível vetor de patógenos. Por outro lado, em sistemas de água clara, essa
3677 substituição não é vantajosa, pois há necessidade de inoculação constante de microalgas
3678 a cada renovação de água e, além disto, fornece as pós-larvas um status nutricional
3679 inferior quando comparada a *Artemia* sp.

3680 Em sistemas de água clara, mesmo com fornecimento de ração, as pós-larvas
3681 buscaram uma fonte de alimento natural, predando sobre o biofilme e assimilando tal
3682 fonte em seus tecidos.

3683 As avaliações de qualidade de pós-larvas são importantes para determinar o
3684 efeito do ambiente no desempenho dos organismos que, mais tarde, será refletido no
3685 momento da engorda. As análises histológicas do hepatopâncreas corroboraram estes
3686 indicadores de qualidade, podendo ser utilizada como ferramenta para confirmação dos

3687 resultados de qualidade de pós-larvas, além disto, esta técnica apresentou-se compatível
3688 com os resultados de isótopos estáveis e, desta forma, contribuíram no entendimento
3689 sobre a influência que cada fonte de alimento disponibilizada, possui sobre o
3690 desempenho das pós-larvas desde a fase de PL₁.

3691

3692

3693

3694

3695

3696

3697

3698

3699

3700

3701

3702

3703

3704