



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

INSTITUTO DE PESCA

**ORGANISMOS-ALIMENTO MARINHOS: BIOLOGIA E CRIAÇÃO DOS
ROTÍFEROS *Brachionus plicatilis* O.F. MÜLLER, 1786 E *Brachionus
rotundiformis* TSCHUGUNOFF, 1921 (ROTIFERA, BRACHIONIDAE)**

Márcia Santos Nunes Galvão e Naoyo Yamanaka

**BOLETIM
TÉCNICO
N° 28**

2000



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

GOVERNADOR DO ESTADO

Mário Covas

SECRETÁRIO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

João Carlos de Souza Meirelles

SECRETÁRIO-ADJUNTO

Lourival Carmo Mônaco

CHEFE DE GABINETE

Vicente de Paula Marques de Oliveira

**COORDENADOR DA AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS
AGRONEGÓCIOS**

José Sidnei Gonçalves

INSTITUTO DE PESCA

DIRETOR DE DEPARTAMENTO

João Donato Scorvo Filho

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**

INSTITUTO DE PESCA

**ORGANISMOS-ALIMENTO MARINHOS: BIOLOGIA E CRIAÇÃO DOS
ROTÍFEROS *Brachionus plicatilis* O.F. MÜLLER, 1786 E *Brachionus
rotundiformis* TSCHUGUNOFF, 1921 (ROTIFERA, BRACHIONIDAE)**

Márcia Santos Nunes Galvão e Naoyo Yamanaka

ISSN 0103-1767

Bol. Téc. Inst. Pesca	São Paulo	28	julho 2000
------------------------------	------------------	-----------	-------------------

GALVÃO, Márcia Santos Nunes

Organismos-alimento marinhos: biologia e criação dos rotíferos *Brachionus plicatilis* O.F. Müller, 1786 e *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 (Rotifera, Brachionidae), por Márcia Santos Nunes Galvão e Naoyo Yamanaka. São Paulo, Instituto de Pesca. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, 2000.

27 p. (Boletim Técnico 28)

639.3.043

G.182-0

Indexadores: ASFA, Biological Abstract, Zoological Records
Tiragem: 300 exemplares

Solicita-se permuta. / Exchange desired.

Endereço/Address

Instituto de Pesca

Av. Francisco Matarazzo, 455

05001-900 -São Paulo - SP - Brasil

Tel:(011) 3871-7536

E-mail: ipesca@sp.gov.br

FAX: (011) 3871-7533

**ORGANISMOS-ALIMENTO MARINHOS:
BIOLOGIA E CRIAÇÃO DOS ROTÍFEROS
Brachionus plicatilis O.F. MÜLLER, 1786
E *Brachionus rotundiformis* TSCHUGUNOFF, 1921
(ROTIFERA, BRACHIONIDAE)**

Márcia Santos Nunes GALVÃO^{1,2}

Naoyo YAMANAKA¹

I - INTRODUÇÃO

Os rotíferos, principalmente as espécies *Brachionus plicatilis* e *B. rotundiformis*, constituem um dos principais alimentos empregados na produção de larvas de organismos aquáticos marinhos. Existe uma razão ecológica para elegê-los como organismo-alimento em atividades produtivas como a Aqüicultura e mais especialmente na larvicultura. No ambiente marinho, são muito abundantes em estuários, onde, em algumas épocas do ano, são os zooplancntes predominantes. A grande maioria é constituída de pequenos herbívoros, menores que 400 µm de comprimento, que consomem fitoplâncton. Larvas de muitos peixes marinhos e invertebrados vivem em estuários onde esses organismos, devido a seu tamanho e comportamento natatório, são presas fáceis. Como resultado dessa associação ecológica natural que evoluiu através de milhões de anos, muitos peixes e invertebrados marinhos são bem adaptados para capturar e utilizar nutricionalmente os rotíferos (HOUDE e ZASTORN *apud* HOFF e SNELL, 1997).

Por muitos anos, rotíferos marinhos e náuplios de *Artemia* têm sido utilizados como alimento inicial de larvas de peixes marinhos. Mais recentemente, esses organismos têm sido empregados comercialmente para criação de larvas de camarões marinhos e peixes de água doce. Outros organismos zooplancntônicos como copépodos, cladóceros, protozoários e larvas de ouriços, ostras e berbigões também são utilizados, mas sem dúvida, rotíferos e *Artemia* têm provado serem mais eficazes.

Apesar dos esforços recentes para o desenvolvimento de dietas artificiais para a larvicultura, os organismos-alimento são, ainda, imprescindíveis, principalmente para aquelas espécies cuja boca é muito pequena e o trato digestivo é incipiente, dificultando a substituição dos organismos vivos por dietas artificiais.

Além disso, é oportuno mencionar a crescente aplicação de rotíferos em estudos de toxicologia aquática, tanto marinha quanto em água doce, devido à rapidez nas respostas, sensibilidade, reprodutibilidade e atrativa conveniência e relação benefício/custo.

* Artigo de Divulgação: Recebido em: 07/01/99

Aprovado em: 25/05/99

¹ Pesquisador Científico - Centro de Pesquisas em Reprodução e Larvicultura - Instituto de Pesca - SAA

² Endereço/Address: Av. Bartolomeu de Gusmão, 192 - CEP 11030-906 - Santos - SP - Brasil

Anualmente são produzidas toneladas de rotíferos no mundo todo para alimentar peixes e crustáceos. A necessidade dessa produção têm incentivado pesquisas para aprimorar tecnologias, a fim de alcançar maior produtividade a um custo mais baixo. Os avanços mais notáveis nos últimos anos foram no aperfeiçoamento da tecnologia de produção, enriquecimento nutricional, estocagem de biomassa e produção de ovos de dormência.

Esse aprimoramento requer conhecimentos sobre comportamento, ciclo biológico, alimentação, melhoramento da qualidade nutritiva e variabilidade entre linhagens desses rotíferos, assim como sobre sistemas de cultivo, recipientes, técnicas de manejo e estocagem.

Neste trabalho são apresentadas, além das técnicas de cultivo existentes, informações básicas sobre a biologia dos rotíferos que permitam adaptar a tecnologias cada vez mais eficientes levando em consideração a natureza do rotífero, a fim de atender a qualquer uma das possibilidades de demanda.

II. BIOLOGIA E CICLO DE VIDA

1 - Classificação

As espécies mais utilizadas em cultivos marinhos são *Brachionus plicatilis* O.F. Müller, 1786 e *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921, cuja classificação é apresentada a seguir:

Filo:	Aschelminthes
Classe:	Rotatoria
Subclasse:	Eurotatoria
Super-ordem:	Monogononta
Ordem:	Brachionida
Família:	Brachionidae
Gênero:	<i>Brachionus</i>

2 - Morfologia

Os rotíferos têm estrutura morfológicamente simples. O corpo é dividido em 3 partes: cabeça, tronco e pé. Uma carapaça externa chamada de lórica envolve o corpo, podendo apresentar espinhos nas porções anterior e posterior. Apresentam sistemas nervoso, digestivo, excretor e reprodutor especializados. O pé, na porção posterior, é utilizado para fixação (Figura 1).

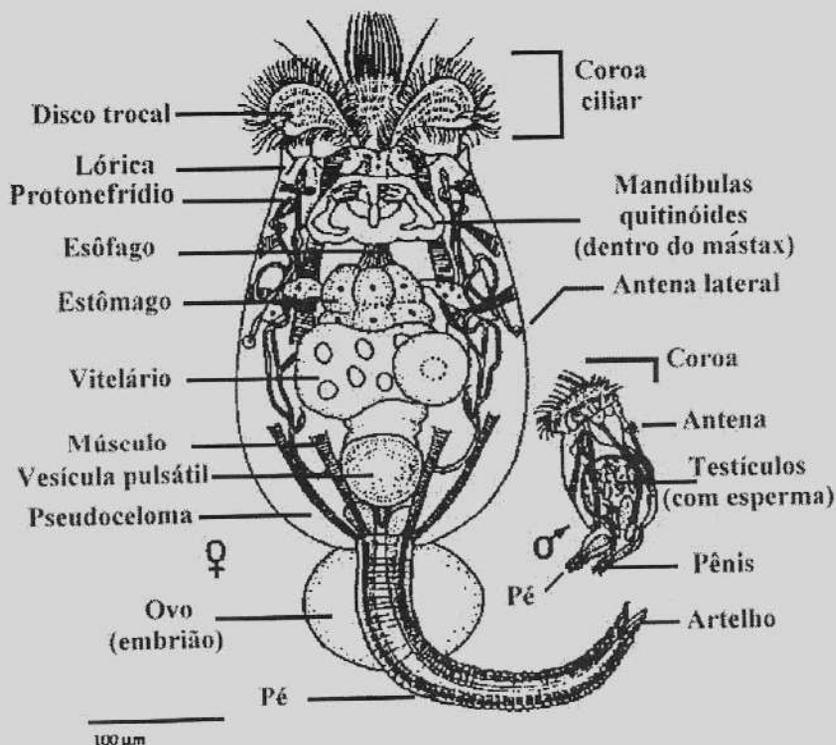


Figura 1 - Morfologia do rotífero (Copiado de KOSTE *apud* FUKUSHO, 1989)

Pequenas partículas são filtradas da coluna d'água, através de uma coroa ciliar localizada na porção anterior do corpo. O alimento filtrado é triturado no mástax. A coroa ciliar permite também a locomoção.

Os machos distinguem-se das fêmeas por apresentarem cerca da metade do tamanho destas e rápido movimento natatório. Não apresentam sistema digestivo e vivem apenas 2 dias, enquanto as fêmeas vivem cerca de 6 a 8 dias.

3 - Ciclo de Vida

Podem reproduzir-se tanto sexuadamente (reprodução míctica) como assexuadamente (reprodução amíctica). Na fase assexuada, as fêmeas amícticas ($2n$) produzem ovos ($2n$) por mitose que darão origem a fêmeas geneticamente iguais ($2n$). Sob condições particulares, as fêmeas passam para a fase sexuada, que ocorre simultaneamente com a reprodução assexuada. Na fase sexuada, as fêmeas mícticas produzem ovos haplóides (n) por meiose, que podem dar origem aos machos (n) ou serem fertilizados pelos espermatozoides (n) dando origem ao ovo de diapausa ($2n$) (Figura 2).

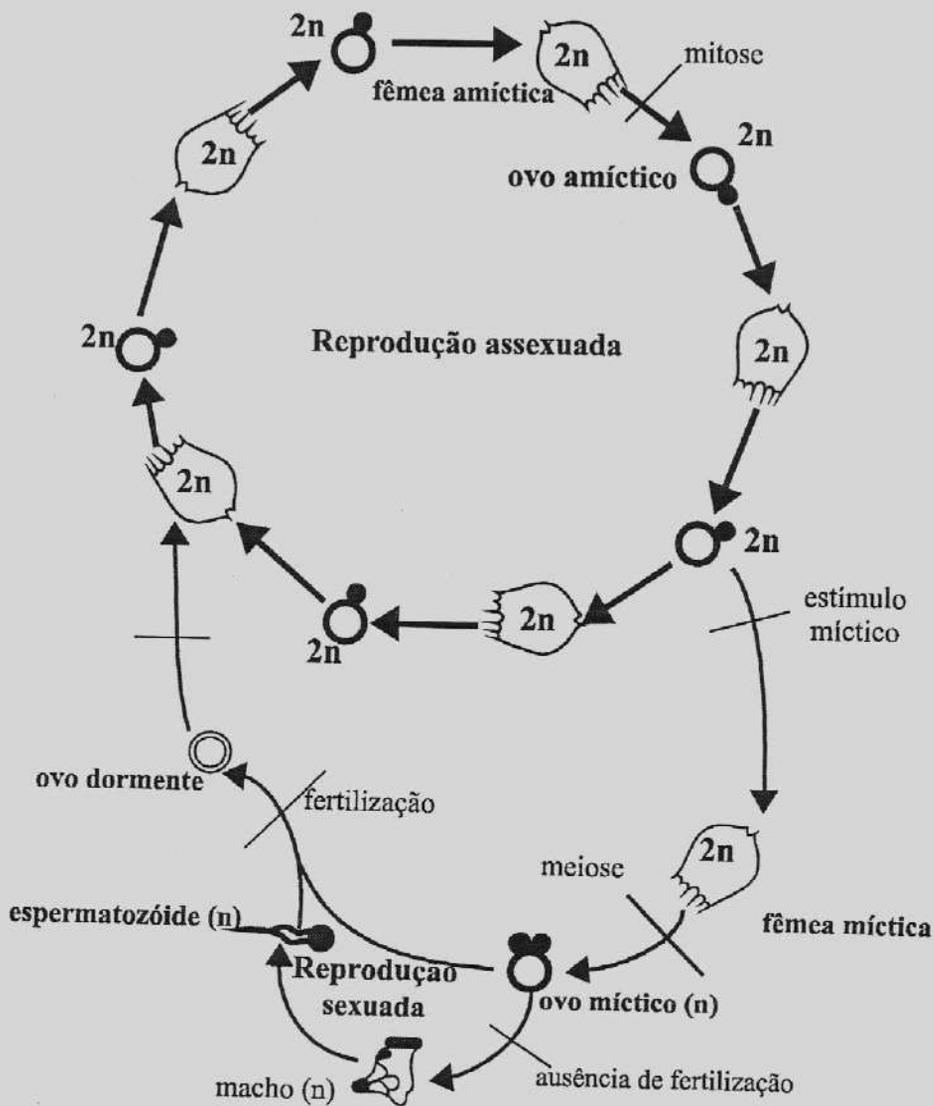


Figura 2 - Ciclo de vida do rotífero

Os ovos de diapausa podem manter-se em latência por vários anos. Quando em condições propícias, eles eclodem. A taxa de formação desses ovos depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos referem-se ao genótipo, que determina o

nível de reprodução sexuada na linhagem. Os fatores extrínsecos referem-se a condições externas como temperatura, salinidade, fotoperíodo, alimentação, entre outros.

Para a produção em massa de rotíferos é interessante que se mantenha a multiplicação amíctica, uma vez que a taxa reprodutiva é maior que na reprodução míctica; os machos são de valor nutricional inferior, pois nem apresentam sistema digestivo; a reprodução sexuada pode causar um colapso na cultura. No entanto, para a estocagem e transporte de linhagens, os ovos de diapausa são mais adequados, pois podem ser estocados por um longo período (FUKUSHO, 1989).

A utilização de ovos de diapausa em aquicultura, à semelhança do que é feito com cistos de *Artemia*, também tem sido proposta por vários autores. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos para se determinar as condições que induzem a formação desses ovos, assim como as condições para sua preservação e eclosão.

4 - Espécies e Linhagens

Os rotíferos são cosmopolitas, existindo inúmeras espécies, subespécies e linhagens. Quando *B. plicatilis* começou a ser usado na aquicultura, tornou-se evidente a ocorrência de 2 grupos com aspectos morfológicos e ecológicos distintos, que foram chamados de tipo "S" ("small") e tipo "L" ("large") (Figura 3).

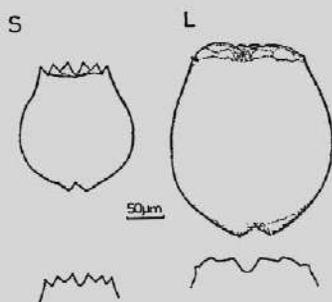


Figura 3 - Rotíferos tipo "S" e tipo "L"

Recentemente, vários estudos realizados sobre morfologia, cariótipo, genética e comportamento reprodutivo mostraram que os 2 tipos de *B. plicatilis* seriam melhor tratados como diferentes espécies. Uma revisão dos nomes disponíveis revelou que *B. plicatilis* O.F. Müller, 1786 e *B. rotundiformis* Tschugunoff, 1921 são os nomes corretos para os tipos "L" e "S", respectivamente (SEGERS, 1995).

Algumas diferenças básicas entre essas 2 espécies são apontadas na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças básicas entre *B. plicatilis* e *B. rotundiformis*

Característica	<i>B. plicatilis</i>	<i>B. rotundiformis</i>
Comprimento da lórica (c)	130 - 340 μm	100 - 210 μm
Largura da lórica (l)	$1=0,6792c + 14,77 \mu\text{m}$	$1=0,8252c + 0,72 \mu\text{m}$
Espinhos anteriores	Angulosos	Pontudos
Adaptação à temperatura	Euritérmico	Estenotérmico
Adaptação à salinidade	Eurihalino	Estenohalino
Densidade populacional em cultivos em massa	Até 500 ind. ml^{-1}	500-1.000 ind. ml^{-1}
Forma	Alongada	Tipo cálice

Fonte: OKAUCHI (informação pessoal)

Existe uma variação considerável de linhagens reconhecidas dentro das inúmeras espécies encontradas em diferentes habitats (FU, HIRAYAMA, NATSUKARI, 1991a,b). A disponibilidade de linhagens de diferentes tamanhos é vantajosa, pois permite escolher aquela que seja apropriada ao tamanho da boca dos seus consumidores.

O tamanho dos rotíferos pode variar também em função das condições ambientais: diminui ou aumenta inversamente à variação da temperatura. Outros fatores, como tipo e quantidade de alimento, densidade populacional durante o cultivo e qualidade da água, também influenciam. Os rotíferos tornam-se maiores, por exemplo, quando alimentados com a microalga *Tetraselmis tetrathele*, seguido por *Nannochloropsis oculata* e, pela levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) (FUKUSHO, 1989).

Assim, o emprego de diferentes linhagens juntamente com a manipulação do ambiente podem garantir a obtenção de organismos de diferentes tamanhos. Na escolha da linhagem a ser cultivada deve-se levar em conta, além do tamanho, a taxa reprodutiva, as condições ótimas de cultivo e a frequência de reprodução sexual.

III. TECNOLOGIA DE CRIAÇÃO

1 - Histórico

As pesquisas com o rotífero de água salobra *Brachionus plicatilis* iniciaram-se no Japão onde, a princípio, era considerado um animal zooplancônico nocivo. Propagava-se em tanques de criação de enguia, exaurindo o oxigênio da água e provocando a

mortalidade em massa das enguias. Entre 1950 e 1960, vários estudos foram conduzidos para conhecer sua morfologia, fisiologia, ecologia e taxonomia, com a finalidade de prevenir sua ocorrência.

Com o desenvolvimento da criação de peixes marinhos, pesquisas foram realizadas para a obtenção de organismos-alimento para larvas e juvenis. Em 1960, Ito (1960) sugeriu a utilização de rotíferos em cultivos marinhos. As pesquisas mostraram que estes eram um excelente alimento devido: a seu pequeno tamanho (100 – 300 μm); ao movimento natatório lento; ao hábito de se manter em suspensão na coluna d'água; a poderem ser cultivado em altas densidades; e à alta taxa reprodutiva.

Inicialmente, eram cultivados em pequenos tanques internos e alimentados com microalgas. No entanto, a produção era insuficiente para atender à demanda de uma larvicultura em grande escala. Em 1967, a levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi introduzida como alimento (HIRATA e MORI, 1967) o que possibilitou a produção em massa desses organismos em tanques grandes, a um custo menor. Entretanto, seu valor nutricional, quando alimentados com levedura, era baixo, principalmente em relação ao teor de ácidos graxos altamente insaturados da série n-3, os quais mostraram ser essenciais para a sobrevivência e crescimento de larvas de peixes. Desse modo, métodos de enriquecimento precisaram ser desenvolvidos para aumentar o valor nutricional dos rotíferos (WATANABE, KITAJIMA, FUJITA, 1983).

2 - Sistemas de produção

As técnicas de cultivo empregadas podem ser em sistemas intensivos ou extensivos.

No sistema intensivo, a produtividade por unidade de área ou volume é superior. Normalmente, este sistema é conduzido em ambientes internos, protegidos, com controle parcial ou total de alguns parâmetros ambientais, enquanto que o extensivo é realizado em ambiente externo, sob condições ambientais naturais, com pouco ou nenhum controle de determinados parâmetros.

3 - Técnicas de cultivo

O cultivo de rotíferos compreende, basicamente, a manutenção de matrizes que servem de estoque e que, quando multiplicadas, são utilizadas para iniciar a produção em massa.

As culturas estoques são mantidas em pequenos volumes (0,5 a 5 L) de água do mar esterilizada e com salinidade de 15 a 25 ‰, que é renovada periodicamente. Para tanto, a cultura é passada por peneiras ou redes com malhagem de 50-90 μm e os rotíferos que ficam retidos são transferidos para outros frascos limpos contendo água do mar esterilizada.

Parte dessas culturas pode ser empregada para dar início a outras em volumes maiores como no esquema exemplificado na Figura 4.

Condições ambientais: salinidade = 15‰; temperatura = 25°C; fotoperíodo = 12 horas

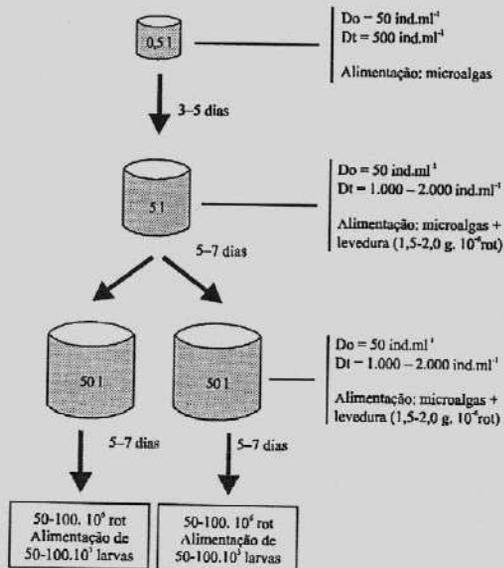


Figura 4 - Esquema de produção de rotíferos no Laboratório de Maricultura do Instituto de Pesca, em Santos. Do = densidade inicial; Dt = densidade final

De acordo com o exemplo, as culturas iniciam-se, em geral, com uma densidade ao redor de 50 ind.ml⁻¹; após 3 a 5 dias, esta aumentará para 500 ind.ml⁻¹, o que representa um total de 250.000 indivíduos em 0,5 L. Esses rotíferos são transferidos para um recipiente maior contendo 5 L de água, onde a densidade inicial será de 250.000 indivíduos/ 5.000ml, ou seja, 50 ind.ml⁻¹. Este processo pode ser repetido sucessivamente para volumes cada vez maiores, até chegar na escala de produção que se pretende para atender a uma larvicultura.

A Figura 5 mostra exemplos de crescimento populacional de *B. rotundiformis* em volumes de 50 L, alimentados com diferentes concentrações da levedura *S. cerevisiae*. Verifica-se que partindo-se de uma densidade inicial de 50 indivíduos.ml⁻¹ e utilizando a levedura na concentração de 2 g.10⁻⁶ rotíferos, foi possível chegar a cerca de 1.000 ind.ml⁻¹ em apenas 5 dias, alcançando uma densidade máxima de 3.800 ind.ml⁻¹ em 8 dias, caindo drasticamente em seguida. O mesmo sucedeu-se quando se utilizou concentrações de levedura de 1,0 e 1,5.10⁻⁶ rotíferos, enquanto na concentração de 0,5g.10⁻⁶ o crescimento populacional foi mais lento, com a densidade populacional mais baixa e mantendo-se a cultura por um período mais longo. Assim, diferentes concentrações de levedura podem ser empregadas de acordo com a finalidade do cultivo. Produção rápida pode ser obtida em concentrações mais altas de levedura, enquanto para a manutenção de estoques, a concentração mais adequada seria 0,5 g.10⁻⁶.

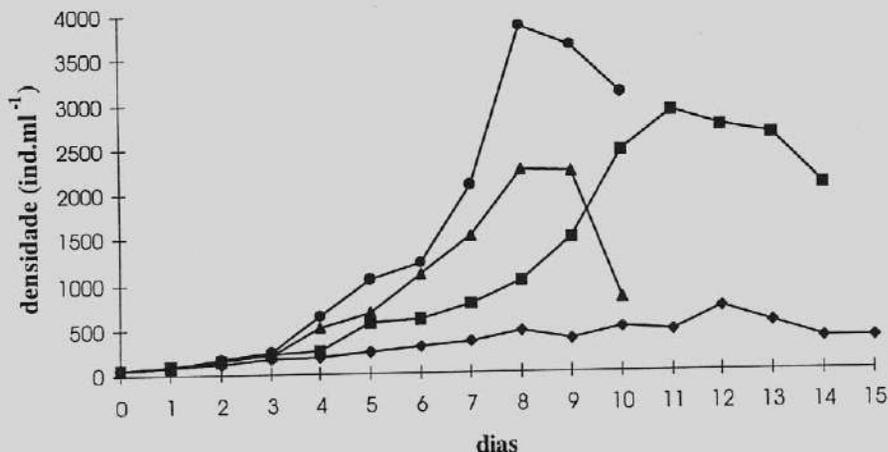


Figura 5 - Variação da densidade populacional de *B. rotundiformis* S1 alimentado com as seguintes concentrações de levedura: 0,5 (◆); 1,0 (■); 1,5 (▲) e 2,0 (●) g.10⁻⁶ rotíferos (GALVÃO, BARRETO, YAMANAKA, 1998).

As técnicas empregadas em cultivo de rotífero são classificadas em: bateria, semi-contínuo, contínuo e retroalimentação.

3.1 - Bateria

Consiste na utilização de uma série de recipientes os quais são inoculados sucessivamente com microalgas e rotíferos, sendo a produção total de um recipiente utilizada de uma vez.

As vantagens incluem: a produção é mais previsível; existe menor risco de contaminação e as culturas estão em pleno desenvolvimento.

Esta técnica é especialmente aplicável em situações em que o suprimento diário necessário de rotífero é conhecido (HOFF e SNELL, 1997).

O cultivo em bateria pode ser realizado em pequena ou grande escala, em tanques pequenos ou grandes.

a) Tanques pequenos

Podem ser utilizados tanques de 0,5 a 1 m³ em ambientes internos, alcançando altas densidades populacionais, ou até 10 m³ em ambientes externos, obtendo-se, nesse caso, densidades populacionais inferiores (HINO, 1993).

Inicialmente, uma cultura diluída de *Nannochloropsis oculata* (10⁵ células.ml⁻¹) é introduzida num tanque com uma densidade alta de rotíferos (50 indivíduos.ml⁻¹). A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é utilizada como alimento a uma concentração de 1-2 g.10⁻⁶ rotíferos/dia. Em 3 a 7 dias, a densidade populacional pode chegar até 1.000 ind.ml⁻¹ ou mais.

GALVÃO, BARRETO, YAMANAKA (1998) produziram *B. rotundiformis* e *B. plicatilis* em tanques de 50 L, alimentados com levedura de panificação nas concentrações de 0,5 a 2,0 g.10⁻⁶ rotíferos por dia. Os cultivos alcançaram densidades de até 3.800 ind.ml⁻¹ para *B. rotundiformis* e 2.197 ind.ml⁻¹ para *B. plicatilis*, obtendo-se produções de 50 a 100.10⁶ rotíferos num período de 5 a 7 dias em apenas 1 tanque de 50 L. Os mesmos autores propõem que o emprego de 7 tanques de 50 L para produção de *B. rotundiformis*, por exemplo, em sistema de bateria, seriam suficientes para sustentar 100.000 larvas de peixes, com uma disponibilidade de 1.000 indivíduos/larva/dia, durante toda a fase de desenvolvimento larval (Figuras 4 e 5).

b) Tanques grandes

Utilizam-se tanques de 50 a 150 m³ onde, inicialmente, se cultiva *N. oculata*. Quando esta atinge a densidade de 10⁶ células.ml⁻¹, os rotíferos são inoculados e alimentados com levedura de panificação. Ao atingirem os rotíferos a densidade máxima ou próxima à máxima é feita a coleta total.

3.2 - Semi-contínuo

São utilizados, normalmente, tanques maiores que aqueles do método de bateria, variando de 100 a 400 m³.

Nessa técnica, a densidade é mantida constante por meio de coletas periódicas. Quando uma dada população alcança densidade desejada, uma parte é coletada sendo, em seguida, adicionada cultura de *N. oculata* para completar o volume. Esse procedimento se repete sempre que a cultura atinge aquela densidade. Comumente, levedura é fornecida para complementar a alimentação. A quantidade de rotíferos coletada não deve exceder aquela que deverá restar para a densidade populacional se recuperar em um dia. A cultura é mantida em uma densidade constante por um período de 7-14 dias sem tratamento da água. Com o uso de biofiltros, este período pode estender-se para 2 ou 3 meses.

No laboratório do Instituto de Pesca, em Cananéia, conduziram-se cultivos do rotífero *B. plicatilis* em tanques de 1,5 e 5,0 m³, utilizando-se o sistema semi-contínuo. Os rotíferos foram alimentados com as microalgas *N. oculata* e *C. ellipsoidea* e a levedura *S. cerevisiae*. Periodicamente, os detritos depositados no fundo dos tanques eram removidos sendo reposta água do mar filtrada e ajustada a salinidade para 15‰. As densidades alcançadas variaram de 300 a 700 ind.ml⁻¹ e foi possível manter esses cultivos por períodos de até 30 dias. Diariamente, parte da produção era removida para alimentar larvas de tainha (*Mugil platanus*).

No Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo", pertencente ao Instituto de Pesca e situado em Pirassununga, SP, *B. plicatilis* foi criado em água doce salinizada a 18‰ com sal grosso marinho, em tanques de até 500 L, em sistema semi-contínuo. As populações mantiveram-se estáveis por longos períodos (cerca de 50 dias) apresentando densidade máxima de 650 ind.ml⁻¹ e média de 100-150 ind.ml⁻¹. Sofreram

desbastes periódicos de até 39% do volume das culturas, que representavam retiradas de 6 a 8 milhões de organismos por dia.

A Figura 6 ilustra, por exemplo, o crescimento populacional de uma cultura de rotíferos submetida a desbastes periódicos, mostrando que a população apresentou recuperação, mantendo-se em níveis razoavelmente constantes (entre 100-150 ind.ml⁻¹). O sistema aplicado mostrou ser eficiente, garantindo uma produção diária de organismos suficiente para viabilizar a larvicultura do curimbatá *Prochilodus scrofa* (PORTELLA *et al.*, 1997).

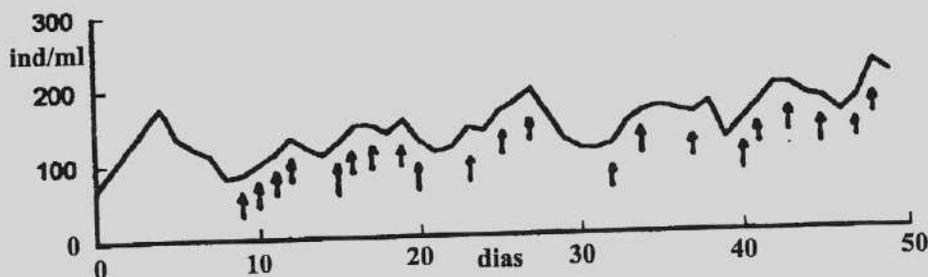


Figura 6 - Curva de crescimento populacional de *B. plicatilis*, em cultivos semi-contínuos, utilizando água doce salinizada. Os desbastes estão indicados pelas setas (PORTELLA *et al.*, 1997)

Recentemente, estabeleceram-se técnicas altamente eficientes para produção em massa de rotíferos usando condensados de *Chlorella* de água doce, enriquecida com vitamina B₁₂ (1 mg/l). *B. rotundiformis* foi criado em tanques de 1 m³ a 28°C, utilizando o sistema semi-contínuo. Diariamente, cerca da metade do volume era retirado e recolocado o mesmo volume de água do mar e acrescidos 2 a 11 L condensado de *Chlorella* enriquecida (15 x 10⁹ células/ml). A densidade populacional foi mantida em 1.000 ind.ml⁻¹ ou mais e o número de rotíferos coletados diariamente excedeu a 0,5 x 10⁹. Duas telas de náilon foram instaladas no fundo dos tanques para remoção diária de sólidos acumulados, tais como animais mortos e fezes (YOSHIMURA *et al. apud* HIRAYAMA e HAGIWARA, 1995).

3.3 - Contínuo

Os organismos são coletados continuamente e a cultura é reabastecida com meio novo e alimento. Certos aparatos são empregados para manter a cultura sob condições estritamente definidas (de fluxo contínuo de alimento, de temperatura, pH, O₂ e salinidade). O cultivo é realizado em ambientes internos e fechados.

É uma técnica complexa e de custo elevado devido à necessidade de equipamentos mas apresenta vantagens como: suprimento contínuo de rotíferos de alta qualidade; controle da contaminação da água; necessidade de pequenos volumes de água e microalgas; automação com conseqüente economia de mão-de-obra; obtenção de taxas altas de produção por um período longo; e pode ser executada continuamente por vários meses sem problemas.

A produtividade num cultivo contínuo é consideravelmente mais alta que num convencional. JAMES e ABU-REZEQ (1989) obtiveram uma produção de $318,84 \times 10^6$ ind/m³/dia a um fluxo de microalgas de 6 L/h em um tanque de 100 L, e de $261,21 \times 10^6$ ind/m³/dia a um fluxo de 40 L/h em unidades de 1 m³.

3.4 - Retroalimentação ("feedback")

Restos da cultura são tratados por bactéria e as substâncias liberadas são usadas para nutrir as microalgas, que são cultivadas num tanque separado. As algas, por sua vez, são utilizadas para alimentar os rotíferos.

4 - Equipamentos e suprimentos

Recipientes e tanques de diferentes formas e tamanhos são empregados, com volumes variando de 1 L a 400 m³. O tamanho do recipiente depende da escala de produção, do sistema (intensivo ou extensivo), da técnica utilizada (bateria, semi-contínuo ou contínuo) e da finalidade da criação (pesquisa, produção comercial).

A água do mar deve passar por um sistema de tratamento adequado, a fim de evitar a presença de agentes contaminantes e de matéria orgânica em suspensão. Um processo de decantação, seguido por filtragem com filtros de diferentes porosidades e esterilização da água por meio de lâmpada ultra-violeta, podem garantir uma boa qualidade de água (Figura 7).

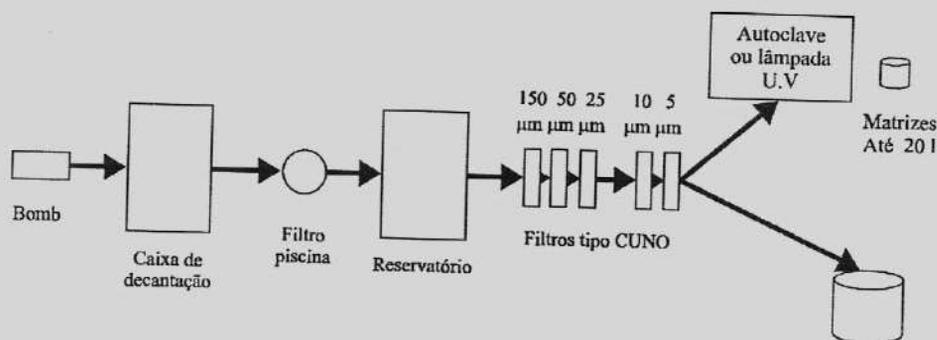


Figura 7 - Esquema do sistema de tratamento de água utilizado no laboratório do Instituto de Pesca, situado em Cananéia

A aeração pode ser feita utilizando-se compressores de ar ou sopradores radiais. Pequenas bombas de ar podem ser empregadas em pequenos recipientes para produção em escala experimental. Os dispersores de ar devem ser distribuídos nos tanques de modo a haver uma boa circulação de água.

A iluminação pode ser natural ou artificial. Para ambientes com luz artificial deve-se usar preferencialmente lâmpadas fluorescentes brancas (luz do dia).

Aquecedores devem ser empregados, quando a temperatura atinge valores inferiores a 20°C ou quando se pretende um controle rigoroso deste parâmetro.

Para a coleta de rotíferos, são necessárias redes com abertura de malha em torno de 60 µm. Coletores automáticos, utilizando o fluxo gravitacional, permitem coletar facilmente grandes quantidades em curto intervalo de tempo.

Para o controle da cultura e monitoramento da qualidade da água são necessários microscópio estereoscópico, contador manual, termômetro, peagômetro, oxigênioômetro, kit para determinação de NH_3 , NH_2 e NO_2 . Materiais como recipientes plásticos, mangueiras, bequers, pipetas, placas de petri e outros são indispensáveis.

5 - Monitoramento

O monitoramento é essencial para se avaliar o desenvolvimento populacional e a condição fisiológica da cultura. É recomendável monitorar diariamente a densidade populacional. Para tanto, podem ser utilizados os seguintes métodos:

a) Retirar uma ou mais amostras do tanque de cultivo, após homogeneização. Fixar a amostra em formalina a 4%. Homogeneizar e retirar subamostras de 1 ml com uma pipeta. Distribuir o conteúdo numa placa quadriculada e contar o número de indivíduos sob lupa. Acima de 200 ind.ml⁻¹, diluir a amostra;

b) Retirar uma ou mais amostras do tanque de cultivo. Homogeneizar e retirar subamostras de 1 ml com pipeta. Contar sob microscópio estereoscópico na própria pipeta. Neste caso, pode-se utilizar amostras fixadas ou não. No caso de não ter sido feita a fixação, após a contagem a amostra pode retornar ao tanque de cultivo. Em densidades superiores a 200 ind.ml⁻¹, usar pipeta de 0,1 ml. Em densidades superiores a 2.000 ind.ml⁻¹ diluir na proporção de 1:10 (v:v).

O monitoramento diário permite definir a quantidade de alimento a ser fornecida e o momento da colheita. Além disso, a taxa reprodutiva pode ser usada como um indicativo da condição fisiológica da cultura.

Existem duas técnicas para se avaliar a condição fisiológica da cultura (HOFF e SNELL, 1997):

a) Determina-se a atividade natatória, observando-se, por um certo tempo, o rotífero colocado sobre uma placa com uma grade milimetrada. Lenta atividade natatória é a primeira indicação de estresse fisiológico;

b) Determina-se a relação de ovos, isto é, o número médio de ovos carregados por cada fêmea. Quando essa relação é inferior a 0,13, é indício que a população está em declínio.

Um outro indicador de estresse é a medida da atividade de certas enzimas digestivas, que são inibidas por compostos tóxicos. Usando-se substratos fluorescentes a atividade enzimática é detectada *in vivo* e quantificada com um fluorímetro. Vinte a quarenta indivíduos são removidos dos tanques de cultivo e expostos por 5 a 10 min a um. Os animais são então lavados e colocados numa cubeta para determinação de sua fluorescência. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional ao nível de atividade enzimática (SNELL, 1991).

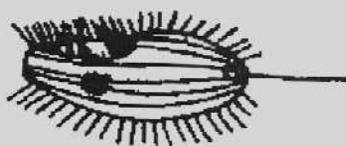
Medidas de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, concentração de amônia e densidade de microalgas devem ser efetuadas regularmente, para manter esses parâmetros em níveis pré-determinados e favoráveis à cultura.

6 - Sanidade

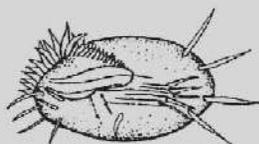
As culturas de rotíferos estão sujeitas a quedas bruscas da população ("crashes"), o que pode comprometer todo um sistema de produção de larvas. Tais colapsos são resultantes do estresse fisiológico, que pode ser causado por diversos fatores como: qualidade da água, declínio da temperatura da água, presença de agentes contaminantes, deficiência nutricional, reprodução mítica, infecção viral, presença de toxinas produzidas por bactérias.

A decomposição bacteriana de alimentos não consumidos e os produtos de excreção animal contribuem para a degradação da água. Esse problema é agravado em culturas com alta densidade populacional em que o alimento é a levedura.

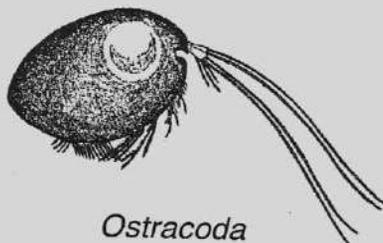
A deficiência de vitamina B₁₂ também restringe o desenvolvimento da cultura. Quedas bruscas na temperatura podem provocar decréscimo na população. A reprodução sexuada e a formação de ovos de diapausa reduzem o crescimento populacional.



Uronema sp



Euplotes sp



Ostracoda

Figura 8 - Agentes contaminantes encontrados em culturas de rotíferos

Dentre os agentes contaminantes mais comuns destacam-se os ciliados *Uronema* sp e *Euplotes* sp e o microcrustáceo Ostracoda (Figura 8). Esses contaminantes podem ser descartados com a utilização de uma peneira ou rede com malha de 50-90 μm onde ficam retidos os rotíferos, que são transferidos para um novo meio de cultura. Recomenda-se, ainda, a lavagem com água doce para desalojar prováveis ciliados aderidos aos rotíferos (HOFF e SNELL, 1997).

ROTHBARD (1975) testou o uso de formalina para o controle de *Euplotes* em tanques de *Chlorella* sp usada como alimento *B. plicatilis*. O autor verificou que concentrações de 20 – 30 mg/l de formalina (37%) no tanque de *Chlorella* destrói quase toda a população de *Euplotes*, sem afetar a *Chlorella*. Um dia após o tratamento, este meio pode ser usado para o cultivo de *Brachionus* sp sem causar danos ao seu desenvolvimento.

Algumas medidas podem ser tomadas para evitar um colapso das culturas: ajuste da taxa de alimentação ou mudança no tipo de alimento para reduzir a quantidade de restos de matéria orgânica; abaixamento do pH e da temperatura para alterar o equilíbrio químico de NH_3 para NH_4^+ ; trocas de água para diluir os metabólitos tóxicos; redução do tempo de cultivo (SNELL, 1991).

Outra medida que pode ser adotada para melhorar a qualidade da água é a remoção de detritos. Esta medida também, permite reduzir o entupimento das redes durante a colheita.

7 - Condições ambientais

7.1 - Temperatura

A temperatura ótima, ou seja, aquela na qual a taxa de crescimento é máxima, depende da espécie e da linhagem que está sendo cultivada. *B. rotundiformis* desenvolve-se melhor em temperaturas mais altas (28°C a 35°C), *B. plicatilis* tolera ampla variação de temperatura, estando a mais adequada entre 18°C e 25°C. Os limites inferiores de temperatura são para *B. rotundiformis* e *B. plicatilis*, 20°C e 10°C, respectivamente (FU, HIRAYAMA, NATSUKARI, 1991a).

Normalmente, temperaturas muito abaixo do ótimo resultam em menor crescimento populacional e as mais altas podem causar estresse térmico e queda na produção. A estabilidade do cultivo em massa é mais fácil de ser mantida em temperaturas intermediárias.

7.2 - Salinidade

B. plicatilis tolera ampla variação de salinidade (1 a 60‰), embora a salinidade que promove melhor crescimento esteja entre 10 e 20‰. Já, *B. rotundiformis* suporta uma amplitude menor de salinidade (HOFF e SNELL, 1997).

Mudanças bruscas na salinidade e temperatura alteram o metabolismo podendo resultar em imobilidade parcial ou completa dos animais, isto porque esses animais usam grande parte de sua energia metabólica para locomoção (OEIE e OLSEN, 1993).

A taxa de filtração diminui em exemplares mantidos em salinidade alta. Portanto, é necessário cuidado ao alimentá-los com culturas de microalgas marinhas ajustando a salinidade de acordo com aquela onde vivem (HIRAYAMA e OGAWA, 1972).

A transferência de rotíferos para água com salinidade muito superior ou inferior àquela na qual estão sendo criados, pode provocar a sua morte. Por isso, essa transferência deve ser feita gradualmente para permitir que se adaptem à nova salinidade. Assim, se os rotíferos são cultivados, por exemplo, a 20‰ e forem utilizados em criação de larvas mantidas em água doce, devem, primeiramente, ser colocados em água na salinidade de 10‰, por 1 dia, antes de serem fornecidos às larvas. Se, caso contrário, forem utilizados para alimentar larvas mantidas a 40‰ devem passar, antes, em salinidade de 30‰ (LUBZENS, 1987).

7.3 - Oxigênio dissolvido

Os rotíferos podem multiplicar-se bem em meio com baixo nível de O_2 (2 mg/L).

A intensidade de aeração necessária para manter um nível ótimo de oxigênio dissolvido depende da temperatura, densidade populacional e tipo de alimento. Em geral, se as microalgas são usadas como única fonte de alimento, a aeração pode ser mais fraca do que com levedura. Isto, porque as algas sob iluminação suficiente produzem oxigênio, enquanto a levedura e as bactérias associadas somente o consomem.

O consumo de O_2 pelos rotíferos aumenta com a temperatura, sendo em torno de $7,07 \times 10^{-5}$ ml O_2 /dia a 20°C, $10,4 \times 10^{-5}$ ml/dia a 25°C e $16,48 \times 10^{-5}$ ml/dia a 30°C (FUKUSHO, 1989).

7.4 - Luz

A condição ótima de luz para criação de rotíferos ainda não foi bem definida. Não se verifica nenhum efeito direto significativo da luz sobre o crescimento populacional. Um efeito secundário parece ser mais importante, pois a luz favorece o desenvolvimento de organismos sensíveis à ela como *Nannochloropsis*.

Recomenda-se intensidade de luz entre 2.000 e 5.000 lux a fotoperíodo de 18 horas (HOFF e SNELL, 1997).

7.5 - pH

O rotífero tolera uma ampla variação de pH (5-10), no entanto, a amplitude ótima, deve estar entre 7,5 e 8,5 (HOFF e SNELL, 1997). O pH influencia indiretamente o crescimento populacional pelo seu efeito sobre a quantidade de amônia (NH_3) na água da cultura. YOSHIMURA *et al.* (1995) reduzindo o pH do meio com HCl, diminuíram a concentração de amônia, o que resultou na obtenção de altas densidades.

7.6 - Amônia (NH₃)

O rotífero apresenta certa tolerância a altos níveis de amônia. No entanto, quando esta atinge níveis muito elevados, pode constituir fator limitantes ao desenvolvimento dos rotíferos causando, até, a queda brusca da população.

A concentração letal de amônia, que reduz a taxa de crescimento para 50%, é de 13,2 mg/l. Mesmo à concentração de 2,1 mg/l, há redução significativa na taxa de crescimento (YU e HIRAYAMA, 1986). HOFF e SNELL (1997) recomendam que as concentrações de amônia não devem exceder a 1 mg/l (1ppm).

A amônia (NH₃) é produzida pela decomposição de material orgânico pelas bactérias. Alimento não consumido e produtos de excreção levam ao aumento do nível de amônia. Metade dos resíduos nitrogenados são excretados sob forma de íon amônio (NH₄⁺), não tóxico, e metade em uréia, de baixa toxicidade. Dependendo da temperatura, salinidade e pH, o íon amônio (NH₄⁺) pode ser convertido em amônia não ionizada (NH₃), tóxica (SNELL, 1991). O efeito da amônia é mais problemático em culturas em que se usa como alimento levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

YOSHIMURA *et al.* (1995) verificaram que a concentração de amônia num meio que foi mantido em pH 6, foi de apenas 2 mg/L, mesmo a cultura tendo atingido altas densidades populacionais. O crescimento populacional de *B. rotundiformis* neste meio foi extremamente ativo, alcançando densidades de até 34.000 ind.ml⁻¹ em volumes de 1 L, demonstrando que a manutenção a um pH baixo permite que a densidade populacional atinja valores dez vezes superiores àquele obtido num pH típico da água do mar (em torno de 8).

8 - Alimentação

8.1 - Tipos de alimentos

O rotífero é um animal filtrador e pode ingerir uma grande variedade de tipos de alimento, incluindo algas, leveduras, bactérias, alimentos inertes e detritos. Os alimentos, normalmente mais utilizados para a produção em massa de rotíferos são microalgas e a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*. Pode ingerir partículas de até 30 µm; no entanto, o tamanho mais comumente oferecido é de 2 a 3 µm, correspondente ao tamanho de *Nannochloropsis oculata* (FUKUSHO, 1989).

a) Microalgas

Existe uma variedade de algas utilizadas para a alimentação de rotíferos, tais como aquelas dos gêneros: *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* e *Chaetoceros*. A escolha da espécie de microalga depende da disponibilidade, da facilidade de cultivo sob as condições locais e das exigências nutricionais dos rotíferos e das espécies alvo (FULKS e MAIN, 1991).

A espécie mais utilizada é a *N. oculata*, devido a sua composição em ácidos graxos altamente insaturados da série n-3, essenciais para o desenvolvimento de larvas

de peixes marinhos. As espécies do gênero *Tetraselmis* também apresentam características nutricionais favoráveis e são bastante empregadas. Outras espécies podem ter qualidades nutricionais superiores para certas larvas de peixes. HOFF e SNELL (1997) sugerem que a utilização de uma combinação de microalgas é vantajosa quando se busca uma dieta para larvas de espécies ainda pouco conhecidas.

O cultivo de microalgas é bastante laborioso e ocupa um grande espaço das instalações de um criadouro. O volume de água necessário para o cultivo de microalgas, dependendo da concentração a ser alcançada, é cerca de 5 a 10 x superior ao da cultura de rotífero. A utilização exclusiva de microalgas como alimento torna a produção em massa muito cara e, até mesmo, proibitiva. Assim, as pesquisas buscam melhores opções de alimento, que sejam de baixo custo e de fácil obtenção.

Recentemente, *Chlorella regularis*, uma espécie de água doce e que pode propagar-se heterotroficamente e é comercializada na forma concentrada tem sido usada no lugar de *N. oculata*.

É possível substituir *Nannochloropsis* fresca congelada, sob a forma concentrada como concentrada única concentrada, fonte de alimento ou como um tratamento de enriquecimento antes de os rotíferos serem fornecidos às larvas. A cultura de algas é centrifugada, produzindo-se uma pasta com 30 a 40% de sólido, a qual pode ser congelada a -20°C ou -70°C . Após o descongelamento, a microalga é suspensa em água do mar. A biomassa algal descongelada pode ser conservada a 4°C , por 7 dias e utilizada para a alimentação sem efeito adverso no conteúdo de ácidos graxos (LUBZENS *et al.*, 1995).

Algas liofilizadas e alimentos sintéticos vêm sendo pesquisados na tentativa de encontrar outras fontes de alimento viáveis e de baixo custo. *Chlorella*, *Spirulina* e *Platymonas suecica* liofilizadas vêm sendo testadas; no entanto, nesses casos, o crescimento da população de rotíferos tem sido inferior àquele obtido com alimentos vivos.

b) Leveduras

A levedura de panificação *S. cerevisiae* é amplamente empregada. No entanto, o valor nutritivo dos rotíferos alimentados com esta levedura é baixo devido à deficiência em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), que são essenciais ao desenvolvimento de larvas de peixes marinhos. No Japão, desenvolveu-se um novo tipo de levedura, denominada de "ω-yeast". Este tipo de levedura é produzido pela adição de óleo de peixe ou óleo de fígado de molusco como suplemento ao meio de cultura de *S. cerevisiae*, resultando numa levedura com alto teor de lipídios e HUFA (IMADA *et al.*, 1979). Os rotíferos alimentados com essa levedura apresentam, conseqüentemente, um valor nutritivo mais elevado.

Técnicas alternativas foram também desenvolvidas para enriquecer os rotíferos alimentados com levedura, que consiste em adicionar lipídios emulsificados ou microalgas diretamente na cultura de rotífero, antes de serem fornecidos às larvas de peixe (WATANABE, KITAJIMA, FUJITA, 1983, WATANABE, 1987).

Pesquisas têm mostrado que a vitamina B_{12} é essencial e que o enriquecimento da levedura *S. cerevisiae* com esta vitamina promove um maior desenvolvimento da cultura (HIRAYAMA e FUNAMOTO, 1983).

A dosagem de levedura empregada em cultivos em massa, normalmente, é de 1-2 g.10⁻⁶ indivíduos, que deve ser parcelada em várias vezes ao dia.

Alguns produtos comerciais foram também desenvolvidos, como, por exemplo, a mistura de levedura fortificada chamada Roti-Rich, produzida pela Florida Aqua Farms. Este produto contém aminoácidos específicos, ácidos graxos essenciais e vitaminas que promovem o aumento populacional (HOFF e SNELL, 1997).

Leveduras marinhas têm sido consideradas como possível fonte de alimento para organismos zooplancônicos marinhos. *B. plicatilis*, quando alimentado com *Candida* sp e *Saccharomyces* sp, apresentou taxa de crescimento superior àquela de rotíferos alimentados com *S. cerevisiae* (SATUITO e HIRAYAMA, 1989).

c) Bactérias

Em tanques de cultivo existe uma densidade relativamente alta de bactérias, que podem servir como alimento para o rotífero e contribuir para a sua reprodução.

O uso de alimentos derivados de bactérias vêm sendo pesquisado. A bactéria é muito pequena, mas em condições adequadas de cultivo formam flocos ou se fixam aos detritos alcançando um tamanho suficiente para serem ingeridas (HINO, 1993).

Dentre as várias linhagens de bactérias estudadas para o cultivo de *B. plicatilis*, apenas 2 linhagens de *Pseudomonas* mostraram resultados satisfatórios. A população aumentou cerca de 4 – 6,5 vezes em 2 a 3 dias (YASUDA e ATAGA, 1980).

Estudos têm demonstrado que na ausência de bactérias a levedura não tem nenhum valor. A bactéria natural fornece certos nutrientes e contribui diretamente para o crescimento populacional de rotíferos (HIRAYAMA e FUNAMOTO, 1983, Yu *et al.*, 1988 e 1989).

A vitamina B₁₂, por exemplo, é um fator limitante na produção em massa. O crescimento populacional de rotíferos alimentados com levedura ou *Nannochloropsis* é maior quando as culturas são complementadas com bactérias que produzem vitamina B₁₂. Um rápido crescimento pode ser observado quando células bacterianas, que produzem vitamina B₁₂, são fornecidas em concentração de 10⁷ – 10¹¹ células/ml, demonstrando a importância das bactérias na suplementação desta vitamina. (Yu *et al.*, 1988).

8.2 - Qualidade de alimento, taxa de ingestão e filtração

A taxa reprodutiva e a sobrevivência dependem da concentração de alimento no meio de cultura. A quantidade a ser fornecida, por sua vez, depende da densidade populacional, salinidade, temperatura e tipo de alimento.

A taxa de ingestão varia com o tipo de alimento, principalmente devido à seletividade exercida pelo rotífero a qual pode ser influenciada pelo tamanho, concentração e estimulantes químicos do alimento (FUNAMOTO e HIRAYAMA *apud* FUKUSHIO, 1989).

A taxa de filtração varia com a temperatura, clorinidade, pH e concentração de alimento. HIRAYAMA e OGAWA (1972) obtiveram maiores taxas de filtração à temperatura de 25°C, clorinidade de 7,8‰, pH 8,0 e na concentração de *N. oculata* de 2,13 x 10⁶ células/ml. Nesta concentração de microalga, o animal alcança uma condição de saciedade. Acima

deste valor, há um decréscimo na taxa de filtração, filtrando apenas a quantidade necessária para encher seu estômago. A taxa de ingestão, por outro lado, tende a aumentar em concentração de até $2,13 \times 10^6$ células.ml⁻¹, mantendo-se praticamente constante acima desse nível, com um valor de cerca de 200 células.min⁻¹.ml⁻¹. Os autores concluem que para a produção em massa, o meio de cultura deve ser mantido nas condições acima citadas, quando a atividade fisiológica está em nível mais alto.

No entanto, as algas são consumidas em menos de 1 hora em culturas mantidas a uma densidade de 200 ind.ml⁻¹, mesmo em concentrações de $2,13 \times 10^6$ células.ml⁻¹. Por isso, o alimento deve ser fornecido inicialmente a uma concentração muito mais alta ou, então, várias vezes ao dia, preferivelmente de forma contínua, a fim de suportar altas densidades populacionais.

GALVÃO *et al.* (1994) observaram que *B. plicatilis* atingiram densidades populacionais mais elevadas quando a dosagem de *Chlorella* sp oferecida como alimento era superior a 5×10^4 células.indivíduo⁻¹. A quantidade total de microalgas necessária é calculada diariamente em função do número de rotíferos na cultura, devendo ser fornecida parceladamente ao longo do dia.

9 - Valor nutricional

9.1 - Composição bioquímica

A composição bioquímica dos organismos zooplancctônicos depende da espécie, da origem, das condições ambientais e do alimento.

Os rotíferos representam excelente fonte de proteína para larvas de peixes. O teor de ácidos graxos nos rotíferos, que depende da composição de seu alimento, mostrou ser o principal fator que determina o seu valor como dieta.

As exigências nutricionais das larvas em relação aos ácidos graxos essenciais diferem de espécie para espécie. Peixes marinhos exigem ácidos graxos altamente insaturados da série n3 (HUFAn-3), tais como o EPA (ácido eicosapentaenóico = 20:5n-3) e o DHA (ácido docosahexaenóico = 22:6n-3), enquanto os peixes de água doce exigem outros ácidos graxos como o ácido linoleico (18:2n-6) e o ácido linolênico (18:3n-3). As larvas de peixes marinhos, quando alimentadas com dietas pobres em HUFAn-3, apresentam alta taxa de mortalidade, menor crescimento, pouca resistência e deformidades.

Os rotíferos alimentados com a levedura *S. cerevisiae* apresentam baixo conteúdo de HUFAn-3 como o 20:5n-3 e alto conteúdo de ácidos graxos monoenóicos tais como o 16:1 e 18:1. Aqueles alimentados com *N. oculata* apresentam alto conteúdo de 20:5n-3, enquanto os alimentados com levedura e *N. oculata* apresentam valores médios. Quando alimentados com *Chlorella* de água doce apresentam alto teor de 18:2n-6 e 18:3n-3 e baixo em HUFAn-3, não sendo, portanto, indicados para peixes marinhos.

Um outro ponto a ser considerado refere-se às enzimas digestivas dos organismos-alimento, as quais têm um importante papel no processo de digestão das larvas. Vários

estudos demonstram que as enzimas existentes no zooplâncton podem contribuir para a atividade enzimática do trato digestivo das larvas, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento, quando o estômago ainda não está formado (LAUFF e HOFER, 1984, MUNILA-MORAN, STARK, BARBOUR, 1990).

9.2 - Técnicas de enriquecimento

A dentre as técnicas empregadas para o enriquecimento de rotíferos, pode-se citar:

a) Cultivo secundário com *N. oculata*

Os organismos alimentados com levedura apresentam um aumento no nível de HUFAn-3, quando submetidos a um cultivo secundário com *N. oculata*. Esse aumento é proporcional ao tempo de cultivo, devido à incorporação de 20:5n-3 da microalga, alcançando uma concentração máxima de 28% após 2 dias de alimentação com *N. oculata*.

b) Método direto

Neste método, os lipídios contendo HUFAn-3 são homogeneizados com uma pequena quantidade de gema de ovo crua e água, resultando numa emulsão que é utilizada

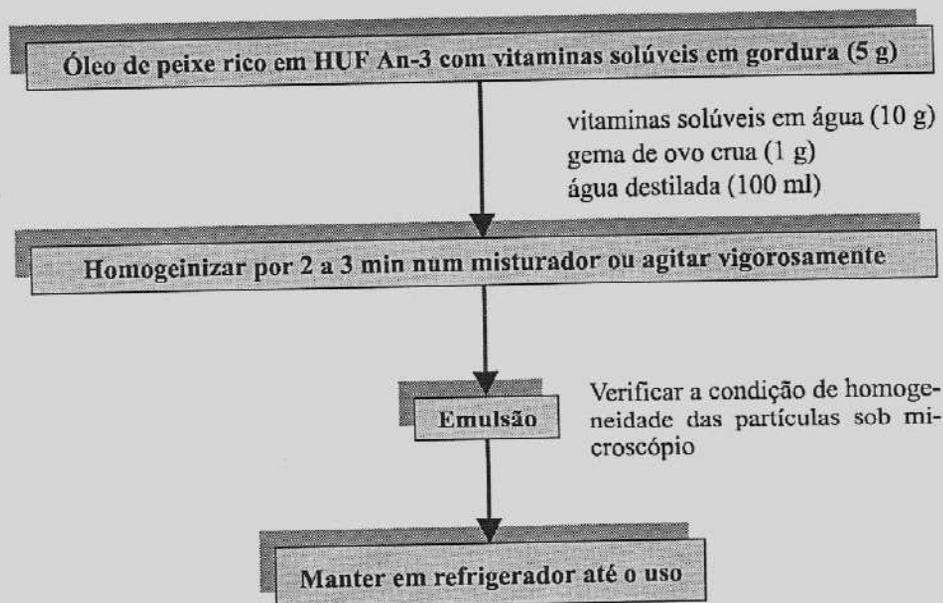


Figura 9 - Esquema do preparo da emulsão (WATANABE, 1988)

para alimentar diretamente os organismos-alimento junto com a levedura de panificação. Vitaminas solúveis em água e outras solúveis em gordura podem ser adicionadas à emulsão antes da homogeneização. A Figura 9 mostra o preparo da emulsão.

Ao se utilizar a emulsão deve-se, antes, agitar vigorosamente, pois pode ocorrer a separação da água e dos lipídios durante a estocagem.

Existem alguns óleos ricos em EPA, DHA e vitaminas que são comercializados e que podem ser facilmente adquiridos, tais como o SELCO, SUPERSELCO e outros produtos comerciais.

c) Método indireto

Baseia-se na alimentação com “ ω -yeast” (*S. cerevisiae* cultivada em meio contendo lipídios), levedura produzida comercialmente no Japão, rica em HUFAn-3. É chamado de método indireto, porque os organismos-alimento são enriquecidos com HUFAn-3 através da levedura, enquanto no método direto eles são alimentados diretamente com lipídios ricos em HUFAn-3. No entanto, a disponibilidade de “ ω -yeast” é limitada; já o método direto pode ser aplicado em qualquer lugar (WATANABE, 1988).

10 - Preservação e estocagem

De acordo com FULKS e MAIN (1991), dentre as razões para a estocagem de rotíferos incluem-se: manutenção e/ou transporte de culturas estoques; preservação por curto prazo para serem usados como organismos vivos; e preservação por longo prazo de animais mortos a serem usados como alimento.

A manutenção de certos clones ou populações para pesquisa ou para aquicultura requer um esforço rotineiro considerável. A estocagem pode reduzir esse esforço. Os organismos preservados podem, ainda, ser utilizados como alimento alternativo em casos de perdas da cultura imprevisíveis.

Para a preservação são considerados quatro métodos: refrigeração, congelamento, criopreservação e estocagem de ovos de dormência. Estes métodos podem ser aplicados a três distintos estádios do ciclo de vida dos animais: fêmeas amféticas, ovos partenogenéticos e ovos de dormência (HAGIWARA e HIRAYAMA, 1993).

10.1 - Refrigeração

As fêmeas partenogenéticas podem ser estocadas a 4°C, a uma densidade de 2.000 ind.ml⁻¹ mantendo-se vivas por cerca de 22 dias. No entanto, os organismos têm que ser alimentados, a água trocada a cada 4-8 dias, a cultura aerada e mantida no escuro. Os rotíferos assim estocados podem ser usados diretamente, após enriquecimento com ácidos graxos, como alimento para larvas de peixes ou para iniciar novas culturas. Este método permite a estocagem por curto prazo de animais excedentes e/ou a estocagem em antecipação a altas demandas num “hatchery” (LUBZENS *et al.*, 1990).

10.2 - Congelamento

Os rotíferos, após serem concentrados, podem ser congelados em água do mar com baixa salinidade (7‰). Antes do congelamento, são alimentados com microalgas e outros nutrientes como ácidos graxos e vitaminas. O congelamento provoca a morte dos organismos. Após o descongelamento, eles podem ser fornecidos às larvas. No entanto, os animais mortos afundam rapidamente na coluna d'água e, conseqüentemente, deve-se promover boa circulação de água para que eles se mantenham em suspensão para serem vistos e capturados pelas larvas de peixe.

10.3 - Criopreservação

Os ovos partenogenéticos podem ser preservados em nitrogênio líquido a -196°C (OKAMOTO *et al.*, 1987, TOLEDO e KUROKAWA, 1990). Esta técnica requer o uso de crioprotetor nos ovos antes do congelamento e só pode ser efetuada em pequena escala. É relativamente cara e pode ser empregada para preservar clones isolados por longos períodos de tempo.

TOLEDO e KUROKAWA (1990) descrevem um método para separação e criopreservação de embriões de *B. plicatilis*. Os embriões foram separados do corpo do adulto por agitação vigorosa durante 10 a 15 min. O melhor resultado foi obtido com embriões no estágio III (estágio de simetria) incubados em DMSO 10% por 30 min e congelados a -196°C . As taxas de sobrevivência após o descongelamento foram de 63%, 62%, 53% e 55% para 3, 7, 15 e 30 dias de estocagem em N líquido, respectivamente.

É possível, ainda, a criopreservação de neonatas, juvenis e fêmeas ovígeras de *B. plicatilis* à temperatura abaixo de -40°C . No entanto, a sobrevivência é muito baixa, sendo a de neonatas e juvenis superior à de fêmeas ovígeras (KING *et al.*, 1983).

10.4 - Estocagem de ovos de dormência ou diapausa

Os ovos de dormência (Figura 10) permanecem num estado de latência enquanto persistem as condições ambientais inibitórias para a eclosão, tais como baixa temperatura, ausência de luz e dessecação. Através da manipulação desses parâmetros, os ovos podem ser estocados ou colocados para eclodir quando for necessário iniciar uma produção em massa ou para fornecer neonatas diretamente às larvas de peixes. O comprimento da lórica de neonatas recém-eclodidos de *B. rotundiformis* varia entre 80 e 130 mm. Estes neonatas podem ser utilizados para larvas de peixes cuja boca seja muito pequena.

Há dados de produção em massa de ovos de diapausa em tanques de 50 m^3 , cujos valores variam de $0,95$ a $4,25 \times 10^9$ ovos/tanque. Esses resultados mostram um avanço para a aplicação desses ovos como uma forma de preservação em massa de rotíferos (HAGIWARA *et al.*, 1993).

Os ovos de dormência podem ser estocados por longo período de tempo em refrigerador. PIMENTEL, GALVÃO, YAMANAKA (1990) verificaram que ovos de *B. plicatilis* podem eclodir após 9 anos de estocagem.

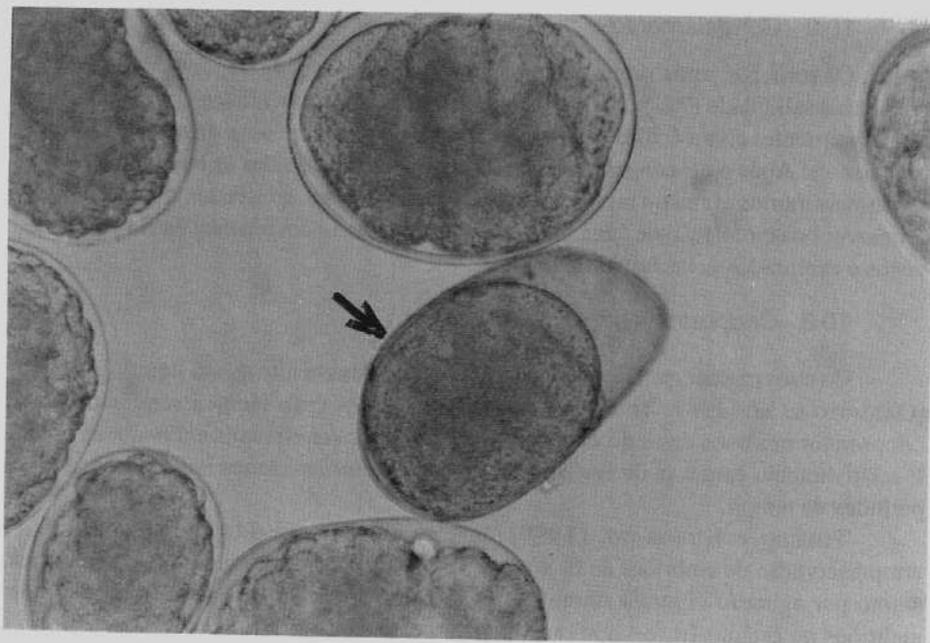


Figura 10 - Ovo de dormência (→)

AGRADECIMENTOS: Ao PqC Marcos Antônio Cestarolli pela revisão deste manuscrito e pelas valiosas sugestões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- FU, Y., HIRAYAMA, K., NATSUKARI, Y. 1991a Morphological differences between the two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp. Biol. Ecol.*, 151: 29-41.
- FU, Y., HIRAYAMA, K., NATSUKARI, Y. 1991b Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 151: 43-56.
- FUKUSHO, K. 1989 Biology and mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (1). *Int. J. Aq. Fish Technol.*, 1: 232-40.
- FULKS, W. e MAIN, K. (Eds.) 1991 *Rotifers and microalgae culture systems*. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu, Hawaii, January 28-31. The Oceanic Institute of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA, 364 p.

- GALVÃO, M.S.N., OLIVEIRA, M.R. de, CRUZ, R.A. da, YAMANAKA, N. 1994 Efeito da alimentação no cultivo de rotíferos (*Brachionus spp*) e de cladóceros (*Daphnia similis* e *Moina* sp). In: *Anais... VIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA*, 11-14 out., Piracicaba, SP, 1994, p. 76.
- GALVÃO, M.S.N., BARRETO, O.J.S., YAMANAKA, N. 1998 Cultivo intensivo dos rotíferos *Brachionus plicatilis* O.F. Müller, 1786 e *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 (Rotifera, Brachionidae). *Bol. Técnico do Instituto de Pesca*, 24, São Paulo, 15p.
- HAGIWARA, A., HAMADA, K., NISHI, A., IMAIZUMI, K., HIRAYAMA, K. 1993 Mass production of rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs in 50 m³ tanks. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 59(1): 93-98.
- HAGIWARA, A. e HIRAYAMA, K. 1993 Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery. In: PROCEEDINGS OF THE FINFISH HATCHERY IN ASIA 91. Tungkang, Taiwan, ROC. December, 17-19, 1991, *TML Conference Proceedings*, 3: 61-71.
- HINO, A. 1993 Present culture systems of the rotifer (*Brachionus plicatilis*) and the function of micro-organisms. . In: PROCEEDINGS OF THE FINFISH HATCHERY IN ASIA, 91. Tungkang, Taiwan, ROC. December, 17-19, 1991, *TML Conference Proceedings*, 3: 51-59.
- HIRATA, H. e MORI, Y. 1967 Culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed on baker's yeast. *Saibai-Gyogyo (Fish Farming)*, 5(1-2): 36-40.
- HIRAYAMA, K. e OGAWA, S. 1972 Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture - I. Filter feeding of rotifer. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38(11): 1207-1214.
- HIRAYAMA, K. e FUNAMOTO, H. 1983 Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (11): 1873-1906.
- HIRAYAMA, K. e HAGIWARA, A. 1995 Recent advances in biological aspects of mass culture of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in Japan. *ICES mar. Sci. Symp.*, 201:153-158.
- ITO, T. 1960 On the culture of mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller in the sea water. *Report Faculty of Fish*, Pref. Univ. Mie, 3 (3): 708-740.
- HOFF, F.H. e SNELL, T.W. 1997 *Plankton culture manual*. 4th Ed. Florida Aqua Farms, Inc., Dade City, Florida, USA; Ralard Printers, San Antonio, Florida, 141 p.
- IMADA, O., KAGEYAMA, Y., WATANABE, T., KITAJIMA, C., FUJITA, S., YONE, Y., 1979. Development of a new yeast as a culture medium for living feeds used in the production of fish seed. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45(8): 955-959.
- JAMES, C.M. e ABU-REZEQ, T. 1989 Intensive rotifer cultures using chemostats*. *Hydrobiologia*, 186/187: 423-430.
- KING, C.E., BAYNE, H.B., CANNON, T.K., KING, A.E. 1983 Cryopreservation of monogonant rotifers. *Hydrobiologia*, 104: 85-88.
- LAUFF, M. e HOFER, R. 1984 Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.

- LUBZENS, E. 1987 Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147: 245-255.
- LUBZENS, G., KOŁODNY, G., PERRY, B., GALAI, N., SHESHIWSKI, R., WAX, Y. 1990 Factors affecting survival of rotifers (*Brachionus plicatilis* O.F. Müller) at 4°C. *Aquaculture*, 91: 23-47.
- LUBZENS, E., GIBSON, O., ZMORA, O., SUKENIK, A. 1995 Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133: 295-309.
- MUNILLA-MORAN, R., STARK, J.R., BARBOUR, A. 1990 The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 88: 337-350.
- OEIE, G. e OLSEN, Y. 1993 Influence a rapid changes in salinity and temperature on the mobility of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255-256: 81-86.
- OKAMOTO, S., TANAKA, M., KUROKAWA, H., KASAHARA, S. 1987 Cryopreservation of parthenogenetic eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(11): 2093.
- PIMENTEL, C.M.M., GALVÃO, M.S.N., YAMANAKA, N. 1990 Observações preliminares sobre a influência de alguns parâmetros ambientais na produção de ovos de resistência pelo rotífero *Brachionus plicatilis*. In: *Anais... XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA*, 28 jan.- 02 fev., Londrina, PR, 1990.
- PORTELLA, M.C., CESTAROLLI, M.A., VERANI, J.R., ROJAS, N.E.T. 1997 Produção de organismos planctônicos para alimentação inicial de larvas de peixes de água doce. *B. Inst. Pesca*, 24 (único): 79-89.
- ROTHBARD, S. 1975 Control of *Euplotes* sp by formalin in growth tanks of *Chlorella* sp used as growth medium for the rotifer *Brachionus plicatilis*, which serves as feed for hatchlings. *Bamidgeh*, 4: 100-109.
- SATUITO, C.G. e HIRAYAMA, K. 1989 Nutritional quality of two species of marine yeasts (*Candida* sp and *Saccharomyces* sp) on the population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186/187: 39-42.
- SEGRS, H. 1995 Nomenclatural consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae). *Hydrobiologia*, 313/314: 121-122.
- SNELL, T.W. 1991 Improving the design of mass culture systems for the rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. Honolulu, HI, The Oceanic Institute, p. 61-71.
- TOLEDO, J.D. e KUROKAWA, H. 1990 Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture*, 91: 385-394.
- YASUDA, K. e ATAGA, N. 1980 Culture of *Brachionus plicatilis* Müller using bacteria as food. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46(8): 933-939.
- YOSHIMURA, K., IWATA, T., TANAKA, K., KITAJIMA, C., ISHIZAKI, F. 1995 A high density cultivation of rotifers in an acidified medium for reducing undissociated ammonia. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 61(4): 602-607.
- YU, J.-P., HINO, A., HIRANO, R., HIRAYAMA, K. 1988 Vitamin B₁₂ - producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon*

Suisan Gakkaishi, 54 (11): 1873-1880.

- YU, J.-P., HINO, A., USHIRO, M., MAEDA, M. 1989 Function of bacteria as vitamin B12 producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (10): 1799-1806.
- YU, J.-P. e HIRAYAMA, K. 1986 The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52: 1509-1513.
- WATANABE, T. 1988 *Fish nutrition and mariculture*. Japan International Cooperation Agency, 233p.
- WATANABE, T. 1987 Nutritional quality of live food organisms and their enrichment. *CMFRI Special Publication*, n° 43, 29p.
- WATANABE, T., KITAJIMA, C., FUJITA, S. 1983 Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a Review. *Aquaculture*, 34: 115-143.



Rettec, artes gráficas.
Largo do Paissandu, 72 3^o andar
tel. (11) 229.6411 - fax (11) 227.9807
E-mail: rettec@uol.com.br

Comitê Editorial do Instituto de Pesca

Editor Chefe: *Maria José Tavares Ranzani Paiva*

Membros: *Idili da Rocha Oliveira*

Carlos Alberto Arfelli

Katharina Eichbaum. Esteves

Yara Aiko Tabata

Revisores científicos para este número:

Fernando André Salles (Instituto de Pesca – Pirassununga – SP)

Lúcia Helena Sipauba-Tavares (CAUNESP – UNESP - Jaboticabal – SP)

Revisor de Língua Portuguesa:

Márcia Navarro Cipolli

Distribuição e divulgação:

Núcleo de Documentação