

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA  
UNIDADE SÃO VICENTE

Avaliação do crescimento de *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 na presença de um complexo de vitaminas e ácidos graxos

Juliana Sanches Stark

São Vicente – SP  
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA  
UNIDADE SÃO VICENTE

Avaliação do crescimento de *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 na presença de um complexo de vitaminas e ácidos graxos

Juliana Sanches Stark

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iracy Lea Pecora

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Habilitação em Biologia Marinha

São Vicente – SP

2009

Stark, Juliana Sanches.

Avaliação do crescimento de *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 na presença de um complexo de vitaminas e ácidos graxos. / Juliana Sanches Stark – São Vicente, 2009. 21 p.

Trabalho de Conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, 2009.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iracy Lea Pecora

**Palavras-chave:** *Brachionus rotundiformis*, crescimento, enriquecimento, óleo de fígado de bacalhau.

*Dedico esse trabalho à minha mãe Marli, meu pai Vicente, meu irmão Felipe e à minha segunda mãe, minha tia Márcia.*

*“Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade”*

*Carlos Drummond de Andrade (1902-1987)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, essa força superior, que me deu sustentação e permitiu que chegasse aonde cheguei.

Agradeço a meus pais, Marli e Vicente, e à minha tia, Márcia, pela dedicação, apoio e paciência no longo caminho que percorri até aqui, e ao meu irmão, Felipe, pelas conversas animadoras, que me estimularam a continuar acreditando.

Ao meu namorado Marcel, pelo carinho, apoio, paciência e empréstimo de seu computador nos momentos que mais precisei.

À minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup> Iracy, pelos ensinamentos, idéias e preocupação durante toda a jornada deste trabalho; também a todos os professores da UNESP- Campus Experimental do Litoral Paulista, que fizeram parte da minha formação acadêmica, transmitindo valioso conhecimento para a vida pessoal e profissional.

Ao Bruno Okasaki, por me passar todo seu conhecimento para a realização e montagem deste experimento. Ao Ayrton (“Senil”) pelas brilhantes idéias e grande ajuda braçal. Ao amigo Marcel (“Mudinho”) que sempre estava pronto para ajudar no que fosse preciso e aos amigos Caio (“Shibinha”) e Fábio (“Tigrão”) pela disposição em sempre responder minhas dúvidas. À Juliana (“Marisco”) pela sua boa vontade e paciência na tentativa de me explicar bioestatística. À prof<sup>a</sup> Alessandra que mesmo longe me ajudou imensamente com a bioestatística da análise dos dados.

Às auxiliares de laboratório, Luciana e Márcia, pela paciência em disponibilizar os materiais utilizados.

E por fim, a todos aqueles verdadeiros amigos e familiares, não importando se estivessem por perto ou longe, que, fosse com um pequeno gesto, palavra ou companhia, ajudaram a manter minha calma e caminhada pra seguir sempre em frente.

Muito obrigada a todos por participarem da minha vida!

## Sumário

I. RESUMO .....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUÇÃO .....	3
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
<b>IV.a. <i>Brachionus rotundiformis</i></b> .....	7
<b>IV.b. Preparação do Material</b> .....	7
<b>IV.c. Tratamentos</b> .....	8
<b>IV.d. Montagem do Experimento</b> .....	8
<b>IV.e. Contagem e Alimentação dos Rotíferos</b> .....	10
<b>IV.f. Tratamento dos dados</b> .....	12
IV. RESULTADOS .....	13
V. DISCUSSÃO .....	15
VI. CONCLUSÃO.....	19
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19

## I. RESUMO

Os rotíferos são amplamente utilizados na alimentação de peixes, principalmente na fase larval, por serem de fácil cultivo, deglutição e compostos de grande quantidade de proteínas. Apesar disso, muitas foram as tentativas de enriquecer ainda mais esse alimento vivo com vitaminas e ácidos graxos essenciais importantes para o crescimento e manutenção das larvas. Este trabalho objetivou avaliar o crescimento de rotíferos, *Brachionus rotundiformis*, sob duas concentrações distintas de um enriquecedor nutricional comercial (emulsão de óleo de fígado de bacalhau) durante 10 dias. Os indivíduos foram alimentados com fermento comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) e os tratamentos receberam, além desse, emulsão Scott<sup>®</sup> contendo vitaminas A, D e ácidos graxos essenciais. Todos os dias foram realizadas contagens da população dos três diferentes tratamentos. Para a análise dos dados foram aplicados os testes estatísticos de ANOVA de duas vias e Turkey. Houve diferença entre o controle, tratamento **es** com menor concentração da emulsão (30µL/dia) e o tratamento **ES** de maior concentração (60µL/dia). Até o 6º dia da experimentação, os três tratamentos seguiram a mesma tendência, sem diferença significativa entre eles, mas a partir do 7º dia o controle cresceu e houve o declínio dos tratamentos **es** e **ES**, sem diferença significativa entre estes últimos. Através deste trabalho, foi possível verificar que os rotíferos conseguiram manter seu crescimento populacional, até o 6º dia de cultivo, tanto na ausência quanto na presença do enriquecedor, em diferentes concentrações, mostrando a viabilidade do enriquecimento com essa emulsão comercial nutritiva.

**Palavras-chave:** *Brachionus rotundiformis*, crescimento, enriquecimento, óleo de fígado de bacalhau.



## II. ABSTRACT

The rotifers are widely used in feed for fish, especially in the larval stage, because they are easy to grow, swallowing and composed of large amounts of protein. Nevertheless, many attempts were made to further enrich the live food with vitamins and essential fatty acids important for growth and maintenance of the larvae. This study aimed to evaluate the growth of rotifers, *Brachionus rotundiformis*, under two different concentrations of a nutrient enriched commercial (oil emulsion cod liver oil) for 10 days. Individuals were fed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and the treatments received, beyond that, Scott<sup>®</sup> emulsion containing vitamins A, D and essential fatty acids. Every day counts were made of the population of three different treatments. For the analysis of data were applied statistical tests of two-way ANOVA and Turkey. There were differences between the control, **es** treatment with less concentrated emulsion (30µL/dia) and **ES** treatment concentration (60µL/dia). By the 6th day of the trial, the three treatments followed the same trend, with no significant difference between them, but from day 7 control increased and there was a decline of **es** and **ES** treatments, with no significant difference between them. Through this study, we found that the rotifers were able to maintain its population growth until the 6th day of culture, both in the absence or presence of enriched in different concentrations, demonstrating the feasibility of enrichment with the commercial emulsion nutritious.

**Keywords:** *Brachionus rotundiformis*, growth, enrichment, cod liver oil.

### III. INTRODUÇÃO

O cultivo de organismos aquáticos no mundo vem crescendo mais a cada ano, e o Brasil vem acompanhando esse crescimento desde 1996 (FAO, 2008).

A aquicultura pode ser desenvolvida tanto para *hobby*, quanto para a atividade comercial primária ou secundária, baseada ainda na produção de espécies ornamentais ou para corte (produção de alimento), dulcícolas, estuarinas ou marinhas. É subdividida, basicamente, em duas fases: a produção de sementes e larvas, e a engorda (Arana, 2004).

A produção de fitoplâncton e zooplâncton está intimamente ligada à aqüicultura. Com o crescente desenvolvimento das técnicas de cultivo, estudos e pesquisas que abordam a produção do plâncton em larga escala tornam-se muito relevantes, uma vez que um dos fatores mais importantes para o sucesso no cultivo de peixes é a utilização de alimento vivo (zooplâncton), especialmente, nos primeiros dias de desenvolvimento das larvas (Tavares e Rocha, 2003).

A larvicultura é a fase mais crítica da criação de peixes, por ser altamente dependente das condições de cultivo, como qualidade da água e suas propriedades físico-químicas e também das características do alimento oferecido, como por exemplo, alto valor nutricional e tamanho adequado de acordo com o tamanho da boca das larvas a serem alimentadas (Arana, 2004). As larvas só aceitarão alimento artificial após a formação do trato digestivo, e certas espécies só aceitarão o plâncton vivo por serem, muitas vezes, dependentes das enzimas digestivas de suas presas (Tavares e Rocha, 2003).

O desenvolvimento de alimento artificial, a partir de dietas formuladas, foi importante para alimentar os peixes nos estágios larvais iniciais, mas problemas como a estrutura, digestibilidade, valor nutricional e a estabilidade das partículas (sem estímulo visual) dificultam a alimentação nessa fase (Planas, 1999), por isso, se torna, cada vez mais importante a necessidade de utilização de organismos planctônicos como alimento natural para larvas de peixes (Tavares e Rocha, 2003).

Os rotíferos são o zooplâncton marinho mais utilizado como alimento vivo na larvicultura, por serem muito pequenos (Medeiros e Hadel, 2008), ter alta taxa de crescimento e grande quantidade de proteínas. Segundo o trabalho de Lee (2009) indivíduos de *Brachionus rotundiformis* são compostos de 63,53% de proteína bruta, e, além disso, são bastante eficientes como alimento vivo, já que se movimentam ativamente estimulando o instinto predador das larvas (ARANA, 2004).

Duas espécies de rotíferos são requeridas para fornecer o ótimo tamanho de presa para as larvas: *Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis* (Planas, 1999). As dimensões da primeira espécie variam de 100 a 210µm e indicam seu uso como primeiro alimento da maioria das espécies, já a segunda é maior alcançando dimensões de 130 a 340µm podendo ser utilizada como segundo alimento para as larvas (Chew & Lim, 2005/2006).

Muitos são os estudos, de produção em massa (Fu et al., 1997; Yoshimura et al, 1997), realizados com rotíferos. Os trabalhos avaliam não apenas o crescimento e o comportamento em diferentes condições físicas e químicas da água, como também o comportamento reprodutivo e alimentar empregando diferentes tipos de alimento, com a finalidade de analisar quais são as condições mais adequadas para o cultivo da espécie em estudo.

O trabalho de Suantika e colaboradores (2003) utilizou um sistema de recirculação simples para a produção de rotíferos, obtendo uma produção confiável com baixos custos.

Outro estudo, realizado por Weithoff (2007), mostra a resistência de duas espécies de rotíferos à privação alimentar, sugerindo que populações de rotíferos podem persistir a longos períodos de privação alimentar.

Já o trabalho de Navarro (1999) envolveu o comportamento alimentar de *B. plicatilis* e *B. rotundiformis* empregando dois tipos de alimento: microalga viva ou congelada, demonstrando que a alga congelada pode ser considerada um alimento nutricional excelente para os rotíferos. Semelhante a este foi o estudo de Seychelles e colaboradores (2009) que utilizaram microalgas concentradas e congeladas enriquecidas com ácidos graxos

essenciais na cultura de *B. plicatilis*, concluindo que formas concentradas e congeladas dessas microalgas são boas substitutas das formas frescas.

Em trabalhos mais antigos, novas formas de alimento para o cultivo em massa de *B. plicatilis* foram testadas, como é o caso de James e colaboradores (1987), que testaram o uso da levedura marinha *Candida* sp. individualmente e a combinação do fermento de pão *Saccharomyces cerevisiae* com a alga *Chlorella* sp, obtendo como resultado um maior crescimento em menor tempo com a *Candida* sp, mas apesar disso, o trabalho mostra que outras formas de alimentação, no caso a combinação do fermento com a alga, podem ser fornecidos sem grandes prejuízos para a população de *B. plicatilis*.

A composição bioquímica do alimento vivo está determinada, na maior parte, pelo tipo de alimento que o zooplâncton recebe, alterando o valor nutricional do alimento vivo; por essa razão, produtos ricos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa são fornecidos, principalmente, aos rotíferos marinhos, para que após a incorporação desses produtos, pelos mesmos, sejam fornecidos como presas aos predadores. A esse método, de fornecer substâncias nutritivas, dá-se o nome de “bioencapsulação” ou “enriquecimento” (ARANA, 2004).

Segundo Hamre e colaboradores (2008), que realizaram o cultivo de rotíferos com cinco diferentes tipos de alimentação quantificando os níveis de nutrientes assimilados, os rotíferos sofrem deficiência de micronutrientes e a incorporação desses pelo organismo seguirá a concentração dos nutrientes presentes na alimentação fornecida, aos rotíferos, no cultivo.

Trabalhos recentes estão avaliando as respostas das larvas ao enriquecimento; como exemplo, o trabalho de Fernández e colaboradores (2008) mostra que o crescimento, sobrevivência, maturação do sistema digestivo e a incidência de deformidades no esqueleto das larvas de dourada (*Sparus aurata*) são afetadas pelas diferentes concentrações de vitamina A fornecidas através da alimentação com *B. plicatilis* enriquecidos. Então, o enriquecimento do alimento vivo, com vitaminas e ácidos graxos insaturados, pode melhorar alguns fatores de crescimento das larvas (Jalali et al., 2008) e por isso se torna importante para a criação.

A emulsão Scott<sup>®</sup> é um preparado emulsionado de óleo de fígado de bacalhau, composto de vitamina A, D e ácidos graxos essenciais (ácido eicosapentaenóico- EPA e ácido docosaexaenóico- DHA).

Muitas espécies de peixes marinhos são, naturalmente, ricos em EPA e DHA, especialmente aqueles de águas frias como salmão, truta e bacalhau, que se alimentam de algas marinhas que produzem tais ácidos e os transferem de maneira eficaz, através da cadeia alimentar, para os peixes. Esses ácidos podem ser transferidos então, através da alimentação, para o ser humano.

Segundo Takahashi (2005) após entrar no organismo humano, o EPA e DHA, podem se transformar em substâncias biologicamente mais ativas, auxiliando a homeostase, a composição estrutural das membranas celulares e do tecido nervoso e cerebral.

Portanto, torna-se importante, o enriquecimento, do alimento-vivo, com óleo de fígado de bacalhau, a fim de melhorar o desenvolvimento larval e aumentar o valor nutricional dos adultos que poderão ser utilizados na alimentação humana. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Brachionus rotundiformis* na presença de duas concentrações distintas de emulsão Scott<sup>®</sup>.

#### **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento teve duração de 10 dias e foi realizado no Laboratório de Aquicultura da UNESP- Campus Experimental do Litoral Paulista, em São Vicente, a fim de avaliar o crescimento populacional de rotíferos, *Brachionus rotundiformis*, na presença de duas diferentes concentrações de um enriquecedor.

#### **IV.a. *Brachionus rotundiformis***

Os indivíduos de *Brachionus rotundiformis* utilizados neste experimento foram gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup> Idili da Rocha Oliveira, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul, do Instituto de Pesca da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (APTA/SAA), localizado em Cananéia (SP).

Os parâmetros, iniciais, avaliados dessa amostra foram: densidade da água 1.018 e salinidade 25, a partir do refratômetro- *Biobrix- 211*. Eviso, e pH 7,43 em pHmetro *WTW- pH Level 1*.

#### **IV.b. Preparação do Material**

As mangueiras e pedras porosas, utilizadas na aeração, foram deixadas de molho em solução diluída de Hipoclorito de sódio (10 – 12%) e posteriormente foram lavadas em água corrente, e, por último em água destilada.

Os frascos, previamente lavados, utilizados na montagem do experimento, assim como a água marinha, previamente filtrada e cedida gentilmente pelo Aquário Municipal de Santos, e a água destilada utilizadas foram autoclavados (autoclave vertical Phoenix Equipamentos Científicos) a 125°C por 15 minutos.

Após a autoclavagem da água marinha, foram realizados ajustes no pH e salinidade de acordo com a água de cultivo de *B. rotundiformis* que seria utilizada. Tanto o pH quanto a salinidade da água de cultivo eram menores, então, a água destilada autoclavada foi utilizada para diminuir a salinidade, e gotas da solução de Ácido Clorídrico (HCl) 1M foram utilizadas para diminuir o pH da água marinha.

Os parâmetros iniciais da água do mar, procedente do Aquário Municipal de Santos, foram 1.025 de densidade, 35 de salinidade e 8,04 de pH, ajustadas para 1.018, 25 e 7,62, respectivamente.

#### IV.c. Tratamentos

Foram realizados 3 grupos experimentais, diferenciados de acordo com a alimentação, com 5 repetições para cada grupo, totalizando 15 frascos.

Os grupos foram classificados em:

- Grupo C: grupo controle, o qual recebia apenas a alimentação do fermento diluído.
- Grupo es: grupo que, além, da alimentação com fermento recebia, por dia, 30 $\mu$ L de emulsão Scott<sup>®</sup>.
- Grupo ES: grupo que, além, da alimentação com fermento recebia, por dia, recebia 60 $\mu$ L de emulsão Scott<sup>®</sup>.

Foram fornecidos, para todos os tratamentos, diariamente, 1mL de solução de fermento, calculado de acordo com o a quantidade de rotíferos, de cada grupo experimental, e o volume do dia, já que 3mL eram retirados de cada frasco para a contagem. Esse volume de 1mL era dividido, igualmente, para que cada frasco recebesse 0,5mL de alimento no final da manhã e 0,5mL no final da tarde.

Para os grupos **es** e **ES** a emulsão Scott<sup>®</sup>, também foi dividida, e 15 $\mu$ L e 30 $\mu$ L eram, respectivamente, adicionados aos frascos desses grupos nos dois períodos de alimentação, totalizando no dia 30 $\mu$ L e 60 $\mu$ L.

#### IV.d. Montagem do Experimento

A suspensão original de rotíferos continha, em média, 205 ind. mL<sup>-1</sup> e como o objetivo inicial era de 30 ind. mL<sup>-1</sup>, foram adicionados 43mL dessa suspensão em cada frasco e adicionados 257mL de água do mar com os devidos ajustes, ficando cada frasco com um volume final de 300mL.

Esse processo de adição da água foi realizado de maneira lenta, com o auxílio de mangueiras e torneiras (Figura 1) para que o choque osmótico e térmico sobre a população de rotíferos fosse o menor possível.



**Figura 1. Adição de água aos frascos com o auxílio de mangueiras e torneiras.**

Os frascos foram dispostos, aleatoriamente, dentro de um grande aquário de vidro com água da torneira (Figura 2). Uma bomba acoplada a uma mangueira e um termostato (Aristos – 200W) permitiram que essa água ficasse a uma temperatura constante de 28°C (Lavens & Sorgeloos, 1996).

A temperatura foi monitorada com dois termômetros de mercúrio de corpo de vidro, um de cada lado do aquário grande, e a aeração leve e constante foi realizada por pedras porosas introduzidas individualmente nos frascos. O fotoperíodo foi de 12L:12D controlado por *timer* digital (A. Santos), com lâmpada fluorescente de 40W (Sylvania Groluz F40W T12).

Após a montagem, realizada a noite, e disposição dos frascos, todos eles receberam a alimentação total do dia de acordo com o grupo experimental e todo o experimento foi envolvido com sacos pretos de plástico, a fim de minimizar a interferência externa da luz. Assim, as amostras sofreram as mesmas influências e foram mantidas sob as mesmas condições durante os 10 dias.





**Figura 2. Disposição aleatória dos frascos em um aquário grande com água, mantendo as mesmas condições de temperatura e luminosidade.**

#### **IV.e. Contagem e Alimentação dos Rotíferos**

A contagem dos rotíferos, no primeiro dia ocorreu após 12h da primeira alimentação e montagem; nos nove dias subsequentes contagens diárias foram realizadas sempre no período da manhã, obedecendo ao limite de 24h da contagem anterior. Totalizando, portanto, 10 dias de contagem.

A contagem foi realizada da seguinte forma: de cada frasco experimental retirou-se 1mL, com pipetador automático de volume fixo de 1mL, em triplicata, e cada 1mL foi subdividido em poços da placa de ELISA (96 poços) para facilitar a contagem. Em cada poço da placa, contendo uma pequena alíquota, foi gotejado formol, e os 3mL de cada placa foram contados no estereomicroscópio da marca *Tecval*, modelo *WF10X* (Figura 3) e posteriormente realizou-se a média dos 3mL de cada placa e, assim, a população total do frasco foi estimada em ind. mL<sup>-1</sup>.

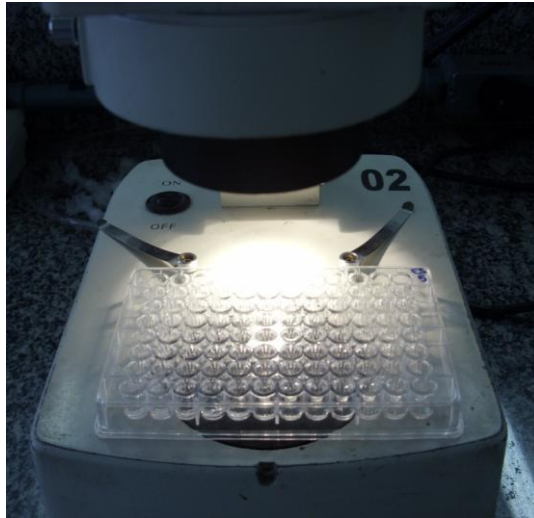
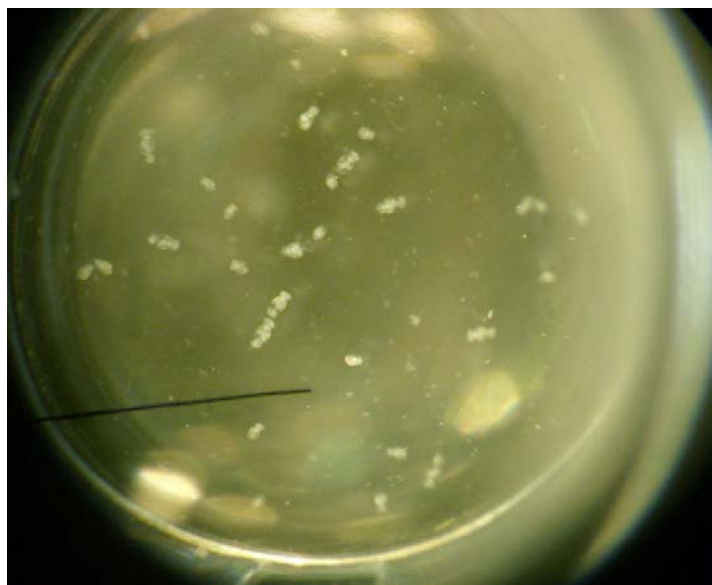


Figura 3. Placa de ELISA com as três alíquotas de 1mL a serem analisadas.

Durante a realização do experimento, os rotíferos foram alimentados, diariamente, duas vezes por dia, uma no final da manhã e outra no final da tarde, com *Saccharomyces cerevisiae* granulado e em pó, utilizado para pães e massas, da marca Fleishmann<sup>®</sup>. O fermento foi devidamente diluído em água marinha visando sempre manter a proporção de 1g de fermento para cada 1.000.000 de rotíferos (Lavens & Sorgeloos, 1996). A diluição da emulsão Scott<sup>®</sup> - óleo de fígado de bacalhau foi baseada no trabalho de enriquecimento realizado por Thomaz e colaboradores (2002), utilizando um nível de dosagem favorável aos animais de 0,1ml/L. O enriquecimento foi realizado juntamente com a alimentação.

Após contar todos os grupos, em estereomicroscópio com fácil visualização (Figura 4), e estimar a população de cada grupo (**C**, **es** e **ES**), de acordo com a quantidade de rotíferos por mL, o fermento em pó foi pesado em balança analítica de precisão (*BEL Engineering – Mark 210A*) e diluído na água salgada com os parâmetros acertados. Tanto na alimentação da manhã quanto na da tarde, adicionava-se 0,5mL dessa diluição de fermento, com o auxílio de pipetas de vidro de 10mL, aos tratamentos. Nesse momento a emulsão Scott<sup>®</sup>

também ocorria de acordo com o tratamento de cada frasco, sendo 15 $\mu$ L para **es** e 30 $\mu$ L para **ES**.



**Figura 4. Visualização de um poço da placa de ELISA sob estereomicroscópio mostrando os indivíduos de *B. rotundiformis*. Aumento de 80X.**

#### **IV.f. Tratamento dos dados**

Para a análise dos dados foi utilizado o programa Statistica 7.0, testando inicialmente premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias, depois foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (ANOVA) para analisar os dois fatores tempo e tratamento. Além deste, foi realizado um teste *a posteriori* para determinar onde se encontravam as diferenças, e para isso foi utilizado o teste de HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey.

São considerados significantes valores de  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS

Foi realizada a ANOVA de dois fatores, onde o fator **um** foi o tempo (dias), e o fator **dois** foram os tratamentos (**C**, **es** e **ES**). O resultado foi significativo ( $p < 0,05$ ) para todos os fatores (Tabela 1) mostrando, então, que existe diferença em relação aos dias e em relação aos tratamentos. Ainda é possível observar a existência de interação entre esses dois fatores, ou seja, o modo como o número médio variou durante os dias de acompanhamento do experimento dependeu do tratamento ao qual pertenciam.

Tabela 1. Resultado obtido pela ANOVA de dois fatores.

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Fator (F)	p
<b>Intercepto</b>	486163.7	1	486163.7	2725.938	< 0.000001
<b>Tempo (F1)</b>	10373.8	9	1152.6	6.463	< 0.000001
<b>Tratamento (F2)</b>	44812.1	2	22406.0	125.632	< 0.000001
<b>Interação F1 XF2</b>	17185.5	18	954.8	5.353	< 0.000001
<b>Erro</b>	74905.9	420	178.3		

Como a ANOVA diz que existe a diferença, mas não mostra onde está, foi utilizado o teste *a posteriori* de HSD de Tukey. Comparando o número médio de rotíferos por dia houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ), apenas, do primeiro em relação aos demais (Figura 5).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos três tipos de tratamento quando comparado o número médio dos rotíferos (Figura 6), onde o controle apresentou maior concentração de indivíduos quando comparado aos tratamentos.

Da análise da interação entre os dois fatores, dias e tratamentos, evidencia-se que os tratamentos começaram e mantiveram uma variação semelhante, em termo de número médio de indivíduos, até o sexto dia. A partir de então começaram a diferir, com o controle diferindo significativamente dos dois tratamentos, que não diferiram entre si (Figura 7).

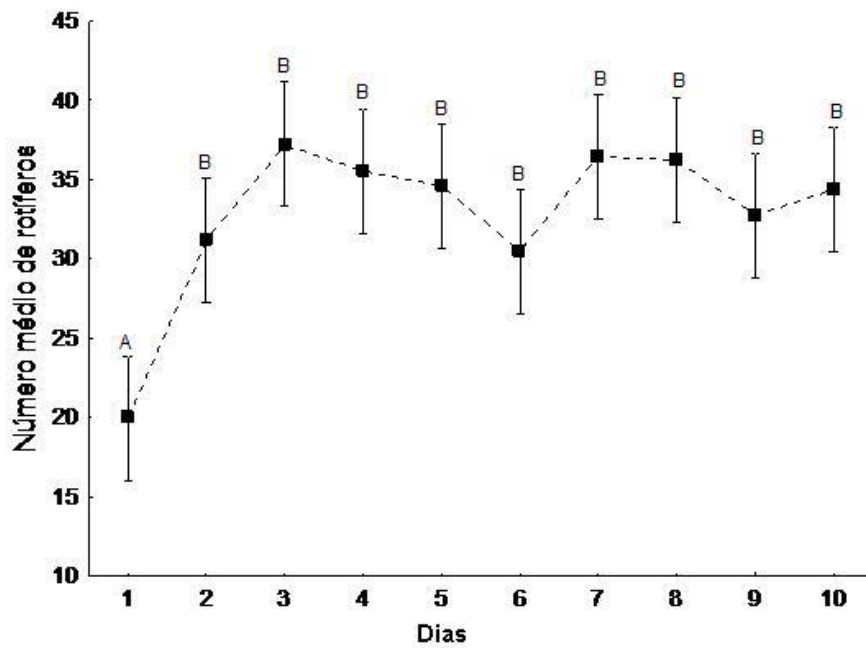


Figura 5. Número médio de *Brachionus rotundiformis*, dos três tratamentos durante os dez dias de experimentação. Letras iguais não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

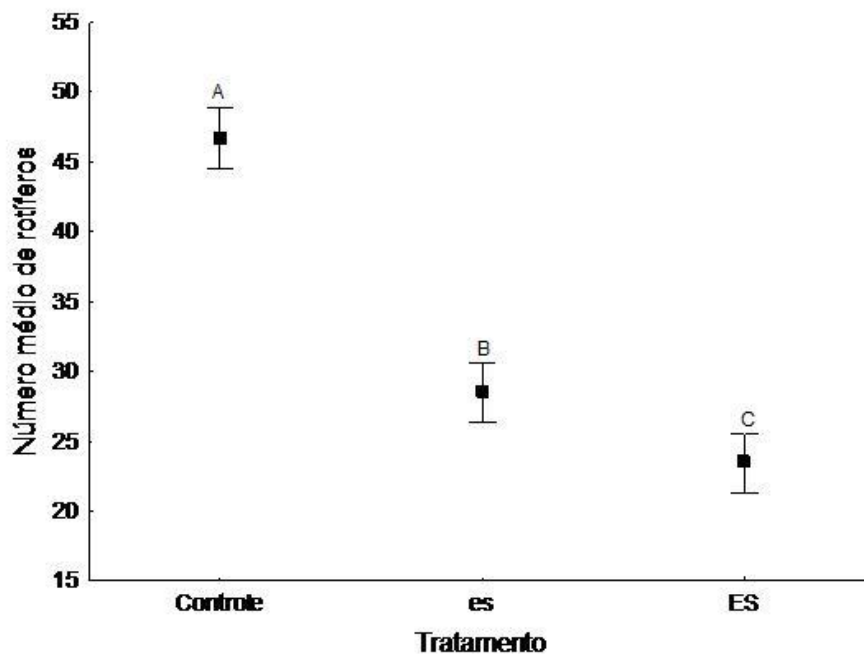


Figura 6. Número médio de *Brachionus rotundiformis* de acordo com o tratamento submetido. Letras iguais não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

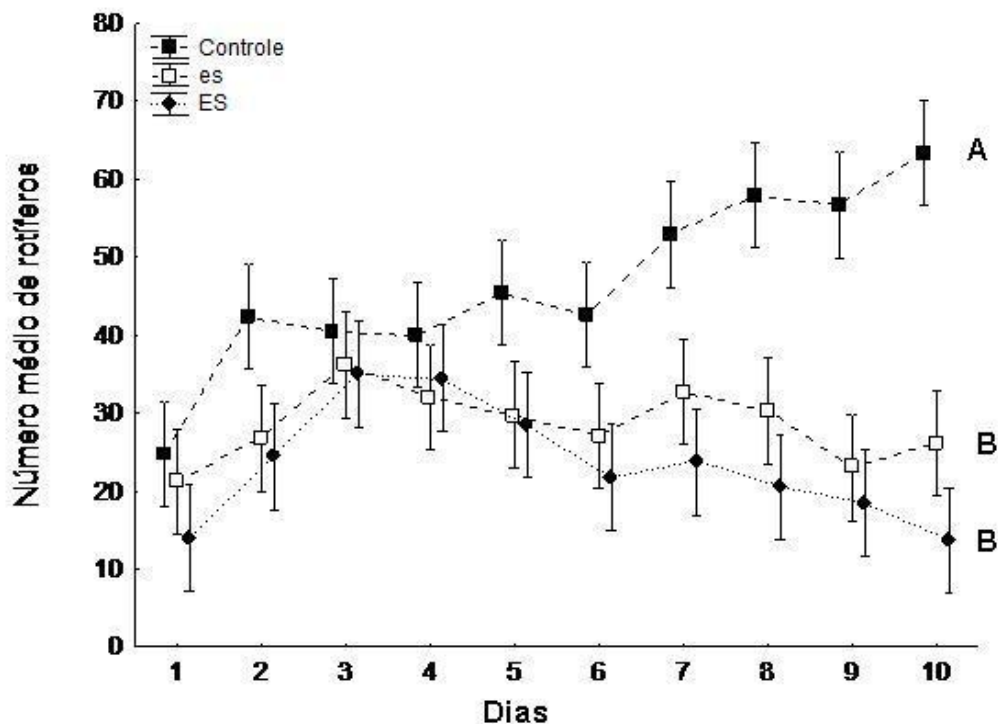


Figura 7. Número médio de *Brachionus rotundiformis* por tratamento ao longo dos dias. Letras iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

## V. DISCUSSÃO

A diferença no número médio total de rotíferos do experimento, diferente apenas no primeiro dia com relação aos demais, pode ser explicado pelo fato da adaptação ocorrida depois das primeiras 12h (primeiro dia) de experimentação. A adição da alimentação total do dia após a montagem pode ter levado a uma grande concentração de alimento, levando os rotíferos a se adaptarem as novas condições a que foram submetidos.

Além disso, quando considerado o experimento como um todo, o aumento do número médio dos animais no grupo **C** e a diminuição nos tratamentos **es** e **ES** fizeram com que o número total não variasse significativamente do segundo até o décimo dia.

Diferenças na alimentação, e conseqüentemente na concentração da emulsão de óleo de fígado de bacalhau, foram significativamente diferentes.

A maior concentração de alimento no tratamento **ES** resultou em um menor número médio de rotíferos nos 10 dias de experimento, seguido de um aumento significativo para o tratamento **es** e maior ainda para **C**.

Em trabalho de Esparcia e colaboradores (1989), *Brachionus plicatilis* foram capazes de manter altas densidades populacionais (média de 35ind. mL<sup>-1</sup>) em concentrações de oxigênio menores que 1mg. L<sup>-1</sup>, mas segundo Lavens e Sorgeloos (1996), altas concentrações de amônia podem ser tóxicas para a sobrevivência desses organismos.

No presente estudo a oxigenação foi realizada com pedras porosas, mas sem quantificação, assim como a amônia que não foi quantificada; sendo assim, pode-se apenas inferir que a maior concentração de alimento aumentou os níveis de amônia nos tratamentos **es** e **ES** prejudicando a sobrevivência dos rotíferos. Entretanto, como o enriquecimento se deu com uma solução rica em ácidos graxos insaturados e vitaminas, pode-se também inferir que a amônia não foi alterada quando em maiores quantidades de alimento.

No presente estudo as concentrações das substâncias presentes nos rotíferos antes e após o enriquecimento não foram avaliadas, mas os resultados mostram que o enriquecimento com óleo de fígado de bacalhau pode ser realizado com eficácia até o sexto dia de cultivo, onde é possível observar um crescimento semelhante entre os tratamentos. Apesar da maioria dos trabalhos não especificarem o tempo necessário para o enriquecimento, pode-se inferir que um tempo de exposição maior à substâncias nutritivas pode aumentar a composição nutricional dos rotíferos.

No trabalho de Thomaz e colaboradores (2002) foi realizada a análise bromatológica de *B. plicatilis* enriquecidos com duas espécies de algas, fermento biológico e óleo de fígado de bacalhau (preparo comercial) evidenciando um aumento considerável de proteína bruta e extrato etéreo, transformando os rotíferos em cápsulas protéicas.

Pode-se afirmar que a partir do sexto dia o enriquecimento deixa de ser interessante para o cultivo. O fato da emulsão Scott<sup>®</sup> ser uma substância

oleosa pode ter dificultado a natação dos rotíferos, já que o estudo realizado por Oie e Olsen (1993) com *Brachionus plicatilis* mostra grande parte da energia metabólica dos rotíferos sendo utilizada para a locomoção.

Além disso, a partir do 6º dia, a concentração de alimento, nos tratamentos **es** e **ES**, pode ter atingido níveis tóxicos para os rotíferos, sendo a absorção quase mínima nessa fase, já que o acúmulo de alimento pode ter se tornado maior do que sua utilização.

Sabe-se que para alguns organismos, altas concentrações de determinadas substâncias podem ser prejudiciais para o crescimento, como é o caso de larvas de *Sparus aurata* que apresentam deformidades no esqueleto quando alimentadas com *B. plicatilis* enriquecido com alta concentração de vitamina A (Fernández et al., 2008), essas altas concentrações podem, também, ser prejudiciais aos rotíferos, que apesar de mostrar certa resistência na concentração e tempo de exposição, apresentam conseqüente declínio da população.

O resultado deste trabalho se mostra divergente ao trabalho realizado em 2006, por Yoshimatsu e colaboradores, que testaram os efeitos da suplementação com cobalto (constituente mineral de vitamina B12) na dieta de *B. rotundiformis* e tiveram como resultado uma densidade significativamente maior de rotíferos em maiores concentrações de cobalto (Figura 8), apesar do número inicial de indivíduos e o tempo de cultivo não terem sido os mesmos utilizados no presente trabalho.

Mas outros resultados do mesmo trabalho, de Yoshimatsu e colaboradores (2006), mostram a diminuição na taxa de sobrevivência dos rotíferos em maiores concentrações de cobalto em 3 e 24h de administração do composto (Figura 9), obtendo valores semelhantes nos três períodos até a concentração de 10mg/ml, sendo que nas concentrações de 100mg/ml e 1000mg/ml as mortalidades em 24h foram maiores, assim como para 3h nas concentrações 100mg/ml, 1000mg/ml e 10.000mg/ml.



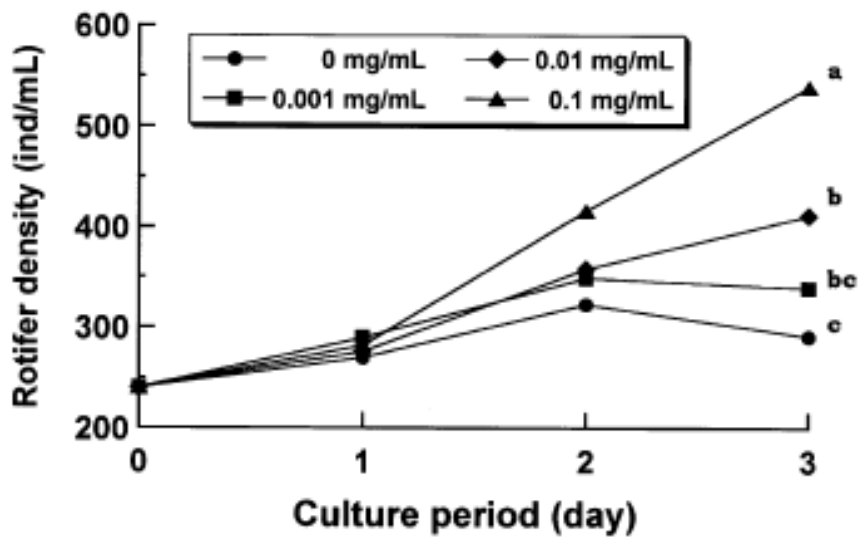


Figura 8. Efeito dos diferentes níveis de cobalto na produção de *B. rotundiformis*. Cada ponto é a média da triplicata dos tratamentos; se não seguidos da mesma letra diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) (retirado de YOSHIMATSU et al, 2006)

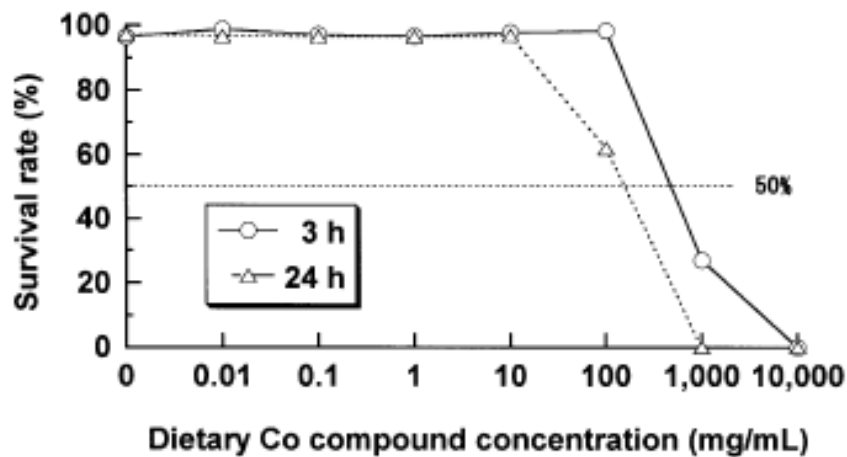


Figura 9. Taxa de sobrevivência de *B. rotundiformis* em diferentes concentrações de cobalto na dieta, após 3 e 24h de administração (retirado de YOSHIMATSU et al, 2006).

O conjunto dos resultados apresentados, tanto no presente estudo como no trabalho de Yoshimatsu e colaboradores, evidencia a baixa resistência dos rotíferos em altas concentrações dos compostos testados, e que apesar

disso, o crescimento pode ser realizado de maneira eficiente em menores concentrações e períodos de exposição.

## VI. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a resistência de *B. rotundiformis* à exposição em concentrações constantes de emulsão de óleo de fígado de bacalhau, utilizada como enriquecedor. Apesar de uma diminuição no número médio de rotíferos ter ocorrido após alguns dias, torna-se possível realizar o enriquecimento em tempos de exposição maiores (no caso dias) para que a assimilação dos nutrientes, possivelmente, se torne maior.

Esse enriquecimento pode ser realizado durante os cultivos dessa espécie de rotífero e se mostra viável até o sexto dia de alimentação, quando a partir desse ponto torna-se inviável.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA, L. V. **Fundamentos de Aquicultura**. Florianópolis, UFSC, 2004, p. 349.
- CHEW, W. Y. S.; LIM, H. S. Some improvements to the rotifer (*Brachionus rotundiformis*) mass culture method. **Singapore J Pri Ind**, v. 32, p. 52-58, 2005/2006.
- ESPARCIA, A.; MIRACLE, M. R. & SERRA, M. *Brachionus plicatilis* tolerance to low oxygen concentrations. **Hydrobiologia**, n. 186/187: p. 331-337, 1989.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. 2008, p.196 – disponível em <<http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>>, acessado em 09/11/2009.

- FERNÁNDEZ, I.; et al. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture**, v. 283, p.102-115, 2008.
- FU, Y.; et al. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. **Hydrobiologia**, v. 358, p. 145-151, 1997.
- HAMRE, K.; et al. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus* sp. may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 51-60, 2008.
- JALALI, M. A.; HOSSEIN, S. A.; IMANPOUR, M. R. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid- enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1286-1291, 2008.
- JAMES, C. M.; DIAS, P. & SALMAN, A. E. The use of marine yeast (*Candida* sp.) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella* sp. For mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Hydrobiologia**, v.147, p. 263-268, 1987.
- LAVENS, P; SORGELOOS, P. (eds.). **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, FAO, n. 361, 1996, p. 295.
- LEE, J. K.; et al. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5255-5259, 2009.
- MEDEIROS, L. R. A.; HADEL, V. F. Rotifera – disponível em <<http://www.biota.org.br/pdf/v3cap11.pdf>>, acessado em 21/10/2009.
- NAVARRO, N. Feeding behavior of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 237, p. 75-87, 1999.

- OIE, G.; OLSEN, Y. Influence of rapid changes in salinity and temperature on the mobility of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Hydrobiologia**, n.255/256, p. 81-86, 1993.
- PLANAS, M.; CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. **Aquaculture**, n. 177, p. 171-190, 1999.
- SEYCHELLES, L. H.; et al. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. **Aquaculture Nutrition**, n.15, p. 431-439, 2009.
- SUANTIKA, G.; et al. Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. **Aquaculture**, n.227, p. 173-189, 2003.
- TAKAHASHI, N. S. Importância dos ácidos graxos essenciais. **Instituto de Pesca** – disponível em <[ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/acidos\\_graxos.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/acidos_graxos.pdf)>, acessado em 08/11/2009.
- TAVARES, L. H. S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos, RiMa, 2003, p. 106.
- THOMAZ, L. A.; OSHIRO, L. M & TRIANI, L. Avaliação bromatológica de rotíferos *Brachionus plicatilis* (O. F. MÜLLER, 1786) enriquecidos. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, UNIVALI, Itajáí-SC, p.271, n. 11009, 2002.
- WEITHOFF, G. Dietary restriction in two rotifer species: the effect of the length of food deprivation on life span and reproduction. **Oecologia**, n. 153, p. 303-308, 2007.
- YOSHIMATSU, T., et al. **Effect of dietary cobalt supplementation on the population growth of rotifer *Brachionus rotundiformis***. **Fisheries Science**, n. 72, p. 214-216, 2006.
- YOSHIMURA, K.; et al. Recent development of high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. **Hydrobiologia**, n. 358, p. 139-144, 1997.