



Impacto da alimentação no crescimento, sobrevivência e na microflora do trato digestivo em larvas de dourada (*Sparus aurata*) e em larvas e juvenis de linguado (*Solea senegalensis*)

Inês Galvão dos Santos

2013

**Impacto da alimentação no crescimento, sobrevivência e na
microflora do trato digestivo em larvas de dourada (*Sparus
aurata*) e em larvas e juvenis de linguado (*Solea senegalensis*)**

Inês Galvão dos Santos

2013



Impacto da alimentação no crescimento, sobrevivência e na microflora do trato digestivo em larvas de dourada (*Sparus aurata*) e em larvas e juvenis de linguado (*Solea senegalensis*)

Inês Galvão dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Mestrado de Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Mestre Teresa Baptista e co-orientação da Doutora Florbela Soares

2013

Impacto da alimentação no crescimento, sobrevivência e na microflora do trato digestivo em larvas de dourada (*Sparus aurata*) e em larvas e juvenis de linguado (*Solea senegalensis*)

Copyright de Inês Galvão dos Santos, da ESTM e do IPL. A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu querido James pelo apoio que sempre me deram nas minhas decisões.

Agradeço também às Doutoradas Teresa Baptista e Florbela Soares pela orientação deste trabalho.

Um sincero obrigado à Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) e a todas as pessoas que lá trabalham pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho no âmbito de um projeto em colaboração com uma empresa.

Resumo

A dourada (*Sparus aurata*) representa uma espécie chave, sendo uma das mais cultivadas na Europa e o linguado-do-Senegal (*Solea senegalensis*) constitui uma espécie com elevado valor comercial e o interesse pelo seu cultivo tem vindo a aumentar nos últimos anos, principalmente no Mediterrâneo. A importância destas duas espécies e o seu interesse comercial torna necessária a otimização dos seus ciclos de produção com especial foco nos cultivos larvares de modo a obter indivíduos de qualidade.

Em aquacultura uma alimentação adequada é muito importante pois está diretamente ligada a um crescimento ótimo, à manutenção de um estado sanitário adequado o que depois se irá refletir numa boa qualidade final das espécies cultivadas. Nas fases larvares é crucial que se forneça uma dieta rica em proteína e em ácidos gordos essenciais, preenchendo os requisitos nutricionais específicos para cada espécie. Após a eclosão, as larvas alimentam-se das suas reservas vitelinas durante um curto período de tempo após o qual tem que ser iniciada uma alimentação exógena que se caracteriza por ser um dos momentos críticos na sobrevivência larvar. Para que as larvas se alimentem é necessário ter em conta o tamanho da abertura das suas bocas e deste modo oferecer a presa com o tamanho mais adequado. O alimento vivo *standard* é composto por microalgas, rotíferos e artémia o que torna necessária a sua produção como cultivos auxiliares.

À parte dos rotíferos e da artémia têm sido feitos esforços para tentar introduzir os cultivos de copépodes na alimentação larvar. Estes micro-crustáceos caracterizam-se por terem uma gama de tamanhos muito variada e apresentam o típico movimento que estimula a atividade predatória das larvas. Os copépodes apresentam um perfil nutricional mais adequado na medida em que possuem um elevado conteúdo de ácidos gordos essenciais como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) que são cruciais para a sobrevivência, desenvolvimento e resistência ao *stress*. Outra vantagem dos copépodes é o fato do seu tempo de retenção no aparelho digestivo das larvas ser maior que o da artémia, garantindo uma melhor digestão e, conseqüentemente, uma melhor absorção dos nutrientes. Contudo, ainda existem algumas barreiras no cultivo destes micro-crustáceos em larga escala, o que ainda não permitiu que estes sejam uma alternativa fiável para substituir os rotíferos ou a artémia.

Sendo que o cultivo larvar está fortemente dependente de uma fonte de alimento vivo, existem algumas desvantagens associadas à sua produção como o elevado custo

da manutenção destes cultivos auxiliares e a probabilidade de ocorrência de um *crash* dos mesmos devido a infecções bacterianas ou virais que interrompem o fornecimento de alimento e aumentam o risco de doença nos organismos cultivados. Assim, para tentar colmatar estes constrangimentos têm sido feitos esforços para criar outras alternativas como o desenvolvimento de dietas artificiais. Contudo, ainda existem alguns constrangimentos na sua utilização como a estabilidade destas micro-dietas na coluna de água, a digestibilidade destas partículas pelas larvas uma vez que o sistema digestivo ainda não está totalmente desenvolvido, não existindo, por vezes, atividade enzimática suficiente para uma digestão eficaz. Na tentativa de ultrapassar estas dificuldades têm-se desenvolvido dietas inertes que se aproximem o mais possível ao alimento natural das larvas, nomeadamente os copépodes preservados.

Um dos fatores que contribui para a saúde e, conseqüentemente, para a qualidade do animal é a flora intestinal que consiste em centenas de diferentes estirpes bacterianas que promovem a digestão e a absorção de nutrientes, potenciando também a resistência a doenças infecciosas na medida em que competem com as espécies patogénicas por nutrientes e locais de adesão. Desta forma, a microflora tem um efeito positivo no crescimento, melhorando também o bem-estar animal. A comunidade microbiana é maioritariamente composta por bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, sendo que os géneros mais comuns são *Vibrio* e *Aeromonas*. O trato digestivo dos peixes é colonizado na fase larvar através da ingestão de água e de alimento vivo, estabelecendo-se uma microflora primária que se caracteriza por ser temporária pois desenvolver-se-á para uma microflora permanente no estado juvenil ou após a metamorfose. Nesta fase, atinge-se um equilíbrio entre as espécies bacterianas residentes no trato digestivo, o que é crucial para a resistência natural contra infecções por parte dos peixes.

Nos ensaios de alimentação com copépodes em larvas de dourada (*Sparus aurata*) e de linguado (*Solea senegalensis*) avaliou-se o impacto no crescimento, sobrevivência e na microflora intestinal de três tratamentos: A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados a uma percentagem de 20 até 100%) e controlo (apenas alimento vivo), sendo que nas larvas de linguado o tratamento A foi de 50% alimento vivo e 50% copépodes preservados até 20 dias após a eclosão (DAE) e de 100% de copépodes preservados até ao final do ensaio (27 DAE).

No ensaio de alimentação em juvenis de linguado (*Solea senegalensis*) avaliaram-se o crescimento, sobrevivência e microflora do trato intestinal consoante duas dietas diferentes: ração com 10% de copépodes e uma ração controlo.

No ensaio em larvas de dourada obtiveram-se resultados significativamente melhores no crescimento com os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados) e controlo (apenas alimento vivo) em que o peso seco foi de $3586,9 \pm 445,8$ e $3596,8 \pm 534,0 \mu\text{g larva}^{-1}$, respetivamente e o comprimento total foi de $15,2 \pm 1,3$ mm para o grupo A e $15,1 \pm 1,2$ mm para o grupo controlo.

No ensaio em larvas de linguado obteve-se um crescimento significativamente melhor no grupo controlo com $9,6 \pm 0,7$ mm de comprimento total e um peso seco de $1225,7 \pm 420,7 \mu\text{g larva}^{-1}$.

Quanto à sobrevivência em ambos os ensaios não houve diferença entre os diferentes tratamentos, sendo que o valor médio para larvas de *Sparus aurata* a 40 DAE foi de $3,1 \pm 3,1$ % e para larvas de *Solea senegalensis* a 27 DAE foi de $70,2 \pm 10,1$ %.

Aos 40 DAE a microflora do trato digestivo das larvas de dourada apresentou uma carga bacteriana significativamente maior no tratamento B com $13,2 \pm 8,0 \times 10^2$ para bactérias em geral e $12,4 \pm 4,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para *Vibrionaceae*.

Nas larvas de linguado com 11 DAE (antes da metamorfose) o tratamento A exibiu uma carga bacteriana significativamente mais elevada com $9,9 \pm 1,9 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ e o grupo controlo apresentou um valor maior para *Vibrionaceae* com $10,4 \pm 4,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹. A 27 DAE (depois da metamorfose) foi o grupo controlo que manifestou uma carga bacteriana significativamente maior com $6,7 \pm 0,6 \times 10^2$ e $5,1 \pm 1,3 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para bactérias em geral e *Vibrionaceae*, respetivamente. Em ambos os ensaios a microflora do trato digestivo era composta maioritariamente pelos géneros *Vibrio* e *Aeromonas*.

No ensaio de alimentação em juvenis de *S. senegalensis* o tratamento controlo apresentou um crescimento significativamente maior com $370,0 \pm 68,7$ mg de peso seco, $960,0 \pm 597,0$ mg de peso húmido e $42,9 \pm 9,8$ mm de comprimento total. A sobrevivência não exibiu diferença significativa pelo que o valor após 60 dias de ensaio foi de $63,4 \pm 17,7$ %.

A carga bacteriana encontrada no intestino dos juvenis foi significativamente maior no tratamento com copépodes com o valor de $38,5 \pm 10,0$ UFC cm⁻¹. A flora microbiana é

composta maioritariamente por *Vibrio* e *Aeromonas*, sendo que os géneros *Photobacterium*, *Brevibacillus* e *Phenon 5* também foram isolados dos dois tratamentos e apenas o género *Micrococcus* foi isolado do tratamento com copépodes.

A utilização dos copépodes preservados em larvas de dourada tem um efeito positivo no crescimento desde que a substituição de alimento vivo seja moderada (até 50%), adotando, assim, uma estratégia de co-alimentação em que se aliou o perfil nutricional mais adequado dos copépodes à disponibilidade do alimento vivo. Nas larvas de linguado o crescimento foi afetado negativamente pelo uso dos copépodes preservados uma vez que as larvas demonstraram uma diminuta aceitabilidade do produto. Deste modo, as larvas alimentadas apenas com presas vivas apresentaram melhores resultados de crescimento. A sobrevivência das larvas de *S. aurata* e *S. senegalensis* não foi condicionada pelo uso de diferentes dietas. As larvas alimentadas com copépodes apresentaram uma carga bacteriana do trato digestivo mais elevada, o que pode estar relacionado com o próprio produto em si e com fato destes micro-crustáceos estarem conservados numa embalagem que ainda se utilizava alguns dias depois de aberta, podendo levar a uma maior contaminação bacteriológica.

Os juvenis de linguado, *S. senegalensis*, exibiram pior crescimento com a ração que continha copépodes, o que também pode ter sido devido a uma aceitabilidade menor desta ração comparando com a ração controlo. A microflora dos juvenis também apresentou um valor mais elevado no tratamento com copépodes, o que pode ter que ver com a adição destes micro-crustáceos à ração, elevando assim a sua carga bacteriana relativamente à ração controlo.

A microbiota intestinal é altamente influenciada pela comunidade bacteriana presente no alimento, e por isso, as propriedades da microflora do alimento devem ser ajustadas, dentro do possível, de modo a evitar efeitos negativos como a transmissão de uma carga bacteriana excessiva. Assim, são necessários mais estudos de modo a aprofundar o conhecimento sobre assuntos como a identificação bacteriana, as adaptações ecológicas por parte destes microrganismos, e ainda, sobre os benefícios e potencial patogénico da microbiota do trato-intestinal que vive fortemente associada a peixes saudáveis.

A utilização dos copépodes preservados como alimento inerte pode não ser adequada a todas as espécies, sendo necessário um melhoramento do produto de modo a elevar a sua aceitabilidade por parte das larvas e dos juvenis nas diferentes espécies de peixes marinhos produzidas.

Palavras-chave: *Sparus aurata*, *Solea senegalensis*, microbiota intestinal, crescimento, sobrevivência.

Abstract

The gilthead seabream (*Sparus aurata*) is considered a key species, once that it represents one of the most cultivated species in Europe. The Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is a species with high commercial value and growth rate with an increasing interest in its culture in recent years, especially in the Mediterranean Sea. The importance of these two species and their commercial interest requires an optimization of their production cycles with particular focus on larval cultures in order to obtain quality individuals.

In aquaculture a proper nutrition is very important because it is directly linked to optimal growth and maintenance of an adequate health state which will reflect a good final quality of the cultured species. In the larval stages it is crucial to provide a diet rich in protein and essential fatty acids, filling the nutritional requirements that are specific to each species. After hatching, the larvae feed on their yolk sac supplies for a short period of time after which an exogenous feeding must be started. This period is characterized as one of the critical moments in larval survival. To feed the larvae it is necessary to have in mind the mouth size in order to offer the most suitable prey. Standard live food consists in microalgae, rotifers and brine shrimp *Artemia* which require its production as auxiliary cultures.

Apart from rotifers and *Artemia*, efforts have been made to introduce copepods in larval feeding. These micro-crustaceans are characterized by a wide range of sizes and by the typical movement that stimulates the predatory activity of larvae. Copepods have a more adequate nutritional profile since they present a high content of essential fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) which are crucial for survival, growth and stress resistance. Another advantage of the copepods is the fact that its retention time in the gut of the larvae is larger than the brine shrimp, ensuring better digestion and, consequently, a better nutrient absorption. However, there are still some barriers in the large scale culture of these micro-crustaceans, which has not allowed them to be a reliable alternative to replace rotifers or brine shrimp *Artemia*.

Since larval rearing is strongly dependent on a live food source, there are some disadvantages associated with its production such as the high cost of the maintenance of these auxiliary cultures and the inherent crash probability due to bacterial or viral infections that disrupt the food supply and increase the risk of disease in cultured organisms. In order to overcome these constraints, efforts have been made to create

alternative food sources such as the development of artificial diets. However, there are still some barriers on its use like the stability of these micro-diets in the water column and the digestibility of these particles by larvae once the digestive system is not fully developed, sometimes, the enzymatic activity is not enough for an effective digestion. In order to overcome these difficulties, inert diets have been developed to be as close as possible to the natural food of larvae, in particular, a diet based on preserved copepods.

One of the many factors that contributes to the health and therefore to the animal quality is the intestinal flora which consists of hundreds of different bacterial strains that promote digestion and nutrient absorption but also enhance resistance to infectious diseases once the indigenous microflora compete with the pathogenic species for nutrients and adhesion sites. Thus, the digestive microflora has a positive effect on growth, improving the well-fare of animals. The microbial community is mostly comprised of Gram negative facultative anaerobic and the most common genera are *Vibrio* and *Aeromonas*. The digestive tract of fish is colonized at the larval stage through ingestion of water and live food, setting up one primary microflora that is characterized as temporary as it will develop into a permanent microflora as juveniles or after metamorphosis. At this stage, it is reached a balance between resident bacterial species in the digestive tract, which is critical for the natural resistance against infections.

In the trials of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sole (*Solea senegalensis*) larvae fed with preserved copepods it was evaluated the impact on growth, survival and intestinal microflora of three treatments: A (50% live food and 50% preserved copepods), B (live food was replaced by preserved copepods at a percentage of 20 to 100%) and control (only live food). In the sole larvae trial the A treatment was 50% live food and 50% preserved copepods up to 20 days after hatching (DAH) and 100% of preserved copepods until the end of the experiment (27 DAH).

In the feeding trial of juvenile sole (*Solea senegalensis*) it were evaluated growth, survival and microflora of the intestinal tract depending on two different diets: diet with 10 % of copepods and control diet.

In the trials of gilthead sea bream larvae, the treatments A (50 % and 50 % live food preserved copepods) and control (only live food) showed significantly better results in growth with a dry weight of $3586,9 \pm 445,8$ and $3596,8 \pm 534,0$ mg larvae⁻¹, respectively, and the total length was $15,2 \pm 1,3$ mm for group A group and $15,1 \pm 1,2$ mm for the control group.

In the trial of sole larvae, the control group presented a significantly better growth with $9,6 \pm 0,7$ mm in total length and a dry weight of $1225,7 \pm 420,7$ mg larvae⁻¹.

The survival in both trials did not show significant differences between the treatments. For *Sparus aurata* larvae of 40 DAH the average value was $3,1 \pm 3,1$ % and for *Solea senegalensis* larvae of 27 DAH was $70,2 \pm 10,1$ %.

At 40 DAH, the microflora of the digestive tract of gilthead sea bream larvae showed a significantly higher bacterial load in treatment B with $13,2 \pm 8,0 \times 10^2$ for general bacteria and $12,4 \pm 4,4 \times 10^2$ CFU larvae⁻¹ for *Vibrionaceae*.

In 11 DAH sole larvae (before metamorphosis), the A treatment exhibited a significantly higher bacterial load with $9,9 \pm 1,9 \times 10^2$ CFU larvae⁻¹ and the control group showed a higher value for *Vibrionaceae* with $10,4 \pm 4,4 \times 10^2$ CFU larvae⁻¹. At 27 DAH (after metamorphosis) the control group showed a significantly higher bacterial load with $6,7 \pm 0,6$ and $5,1 \pm 1,3 \times 10^2$ CFU larvae⁻¹ for *Vibrionaceae* and general bacteria, respectively. In both trials the microflora of the digestive tract was mainly composed by *Vibrio* and *Aeromonas* genera.

In the feeding trial with *S. senegalensis* juveniles, the control treatment grew significantly larger with $370,0 \pm 68,7$ mg of dry weight, $960,0 \pm 597,0$ mg of wet weight and $42,9 \pm 9,8$ mm in total length. The survival showed no significant difference between treatments and the average value, after 60 days of experiment, was $63,4 \pm 17,7$ %.

The bacterial load found in the juvenile's intestines were significantly higher in copepods treatment with the value of $38,5 \pm 10,0$ CFU cm⁻¹. The microbial flora mainly consists of *Vibrio* and *Aeromonas*, and the genera *Photobacterium*, *Brevibacillus* and *Phenon 5* were also isolated from two treatments and only the *Micrococcus* genera was isolated from copepods treatment.

The use of preserved copepods on gilthead sea bream larvae had a positive effect on growth only if the replacement of live food is moderate (50%), adopting thus a strategy of co-feeding which combines the appropriate nutritional profile of copepods to the availability of live food. In sole larvae, growth was negatively affected by the use of preserved copepods once the larvae showed little acceptance for the product. Therefore, only sole larvae fed with live prey showed better growth. Larval survival of *S. aurata* and *S. senegalensis* was not constrained by the use of different diets. The larvae fed on copepods had a higher bacterial load of the digestive tract, which may be related to the

product itself and the fact that these micro-crustaceans are kept in a package that is still used a few days after opening could lead to greater bacterial contamination.

Juvenile sole, *S. senegalensis*, fed with the diet containing copepods showed the worst growth, which also may have been due to a low acceptability of this feed compared with the control diet. Microflora of the digestive tract of juvenile sole also showed a higher value in the treatment with copepods, which may have to do with the addition of these micro-crustaceans to the feed, thereby increasing its bacterial load.

The intestinal microbiota is highly influenced by the bacterial community present in food, and therefore, the properties of the microflora from food should be adjusted, as possible, to avoid negative effects such as the transmission of an excessive bacterial load. Thus, further studies are needed in order to extend the knowledge on subjects such as bacterial identification, ecological adaptations by these microorganisms, and also about the benefits and pathogen potential of intestinal microbiota that lives strongly associated with healthy fish.

The use of preserved copepods as an inert diet may not be suitable for all species, requiring an improvement of the product in order to increase its acceptability by the produced marine species larvae and juveniles.

Keywords: *Sparus aurata*, *Solea senegalensis*, intestinal microbiota, growth, survival.

Índice de matérias

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Aquacultura no mundo..... | 1 |
| 1.2. Dourada, <i>Sparus aurata</i> | 1 |
| 1.2.1. Características morfológicas..... | 1 |
| 1.2.2. Distribuição geográfica | 2 |
| 1.2.3. Biologia da espécie..... | 2 |
| 1.2.4. Reprodução..... | 3 |
| 1.2.5. Ciclo de produção de dourada..... | 3 |
| 1.3. Linguado, <i>Solea senegalensis</i> | 6 |
| 1.3.1. Características morfológicas..... | 6 |
| 1.3.2. Distribuição geográfica | 7 |
| 1.3.3. Biologia da espécie..... | 7 |
| 1.3.4. Reprodução..... | 7 |
| 1.3.5. Ciclo de produção de linguado | 8 |
| 1.4. Alimentação..... | 9 |
| 1.4.1. Alimentação larvar..... | 10 |
| 1.4.2. Alimentação de peixes adultos | 12 |
| 1.5. Microbiota do trato digestivo dos peixes | 12 |
| 1.6. Objetivo | 13 |
| 2. Material e métodos | 15 |
| 2.1. Ensaio larvares de dourada e linguado: alimentação com copépodes..... | 15 |
| 2.1.1. Peixes e condições de cultivo..... | 15 |
| 2.1.2. <i>Design</i> experimental..... | 16 |
| 2.1.3. Cultura de microalgas..... | 18 |
| 2.1.4. Enriquecimento de rotíferos e de metanúplios de artémia | 19 |
| 2.1.5. Copépodes preservados..... | 19 |
| 2.1.6. Análise microbiológica..... | 19 |
| 2.1.7. Análise morfométrica..... | 21 |
| 2.2. Ensaio de alimentação com copépodes em juvenis de linguado..... | 21 |
| 2.2.1. Peixes e condições de cultivo..... | 21 |
| 2.2.2. <i>Design</i> experimental..... | 22 |
| 2.2.3. Análise microbiológica..... | 22 |
| 2.2.4. Análise morfométrica..... | 23 |
| 2.3. Análise estatística..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Resultados | 25 |
| 3.1. Ensaios larvares de alimentação com copépodes em dourada e linguado | 25 |
| 3.1.1. Crescimento e sobrevivência larvar | 25 |
| 3.1.2. Crescimento e identificação bacteriana | 30 |
| 3.2. Ensaios alimentares com copépodes em juvenis de linguado | 38 |
| 3.2.1. Crescimento e sobrevivência dos juvenis | 38 |
| 3.2.2. Crescimento e identificação bacteriana | 40 |
| 4. Discussão..... | 45 |
| 5. Conclusão | 53 |
| 6. Referências Bibliográficas | 55 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1.1 - Distribuição geográfica da dourada, <i>Sparus aurata</i> | 2 |
| Fig. 1.2 - Principais países produtores de dourada, <i>Sparus aurata</i> | 3 |
| Fig. 1.3 - Ciclo de produção de <i>Sparus aurata</i> em regime extensivo. | 5 |
| Fig. 1.4 - Ciclo de produção de <i>Sparus aurata</i> em regime intensivo. | 6 |
| Fig. 1.5 - Distribuição geográfica do linguado, <i>Solea senegalensis</i> | 7 |
| Fig. 2.1 - Amostragens microbiológicas do ensaio das larvas de <i>Solea senegalensis</i> | 20 |
| Fig. 3.1 - Crescimento em comprimento total (CT) de larvas de <i>Sparus aurata</i> para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). | 25 |
| Fig. 3.2 - Crescimento em peso seco (PS) de larvas de <i>Sparus aurata</i> e plano alimentar para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo)..... | 26 |
| Fig. 3.3 - Sobrevivência larvar de <i>Sparus aurata</i> para os três tratamentos: A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo)..... | 27 |
| Fig. 3.4 - Crescimento comprimento total (CT) em larvas de <i>Solea senegalensis</i> para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). | 28 |
| Fig. 3.5 - Crescimento em peso seco (PS) de larvas de <i>Solea senegalensis</i> e plano alimentar para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo)..... | 29 |
| Fig. 3.6 - Sobrevivência larvar de <i>Solea senegalensis</i> para os três tratamentos: A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo)..... | 30 |
| Fig. 3.7 - Número de UFC larva ⁻¹ que cresceram em meio TSA no início do ensaio (antes da introdução de copépodes) e no final do ensaio nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de <i>Sparus</i> | |

aurata. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a e b.
.....31

Fig. 3.8 - Número de *Vibrionaceae* (UFC larva⁻¹) que cresceram em meio TBCS no início do ensaio e no final do ensaio nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Sparus aurata*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a e b.31

Fig. 3.9 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no início do ensaio em larvas de *Sparus aurata*.32

Fig. 3.10 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no final do ensaio para os três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo), em larvas de *Sparus aurata*.32

Fig. 3.11 - Número de UFC larva⁻¹ x10¹ que cresceram em meio TSA no início do ensaio (5 DAE), antes da metamorfose (11 DAE) e depois da metamorfose e final do ensaio (26 DAE) nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Solea senegalensis*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a, b e c.34

Fig. 3.12 - Número de *Vibrionaceae* (UFC larva⁻¹) que cresceram em meio TBCS no início do ensaio (5 DAE), antes da metamorfose (11 DAE) e depois da metamorfose e final do ensaio (26DAE) nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Solea senegalensis*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a, b e c.35

Fig. 3.13 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no início do ensaio em larvas de *Solea senegalensis*.35

Fig. 3.14 - Percentagem de géneros de bactérias identificados antes da metamorfose (11 DAE) das larvas de *Solea senegalensis*.36

Fig. 3.15 - Percentagem de géneros de bactérias identificados depois da metamorfose (27 DAE) das larvas de *Solea senegalensis*.37

Fig. 3.16 - Crescimento em comprimento (CT) de juvenis de *Solea senegalensis* para os tratamentos de copépodes e controlo.38

Fig. 3.17 - Crescimento em peso húmido de juvenis de *Solea senegalensis* para os tratamentos de copépodes e controlo.39

| | |
|--|----|
| Fig. 3.18 - Sobrevivência de juvenis de <i>Solea senegalensis</i> para os tratamentos copépodes e controlo..... | 40 |
| Fig. 3.19 - Número de UFC cm ⁻¹ que cresceram em meio TSA provenientes do intestino de <i>Solea senegalensis</i> para os tratamentos copépodes e controlo. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, <u>a</u> e <u>b</u> | 40 |
| Fig. 3.20 - Número de <i>Vibrionaceae</i> (UFC cm ⁻¹ x10 ²) que cresceram em meio TCBS, provenientes do intestino de <i>Solea senegalensis</i> para os tratamentos copépodes e controlo..... | 41 |
| Fig. 3.21 - Valores de pH no intestino nos tratamentos copépodes e controlo em <i>Solea senegalensis</i> | 41 |
| Fig. 3.22 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no início do ensaio em juvenis de <i>Solea senegalensis</i> | 42 |
| Fig. 3.23 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no final do ensaio para o tratamento com copépodes em juvenis de <i>Solea senegalensis</i> | 42 |
| Fig. 3.24 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no final do ensaio para o controlo em juvenis de <i>Solea senegalensis</i> | 43 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 2.I - Plano de alimentação das larvas de <i>Sparus aurata</i> para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). A quantidade de alimento está expressa em indivíduos ml ⁻¹ . Rot – Rotíferos, N Art – Náuplios de artémia (AF, VNBS, Vinh Chau, Vietnam), Met Art – Metanáuplios de artémia (EG, Aquafeed Premium, Great Salt Lake, USA), Cop – Copépodes..... | 17 |
| Tabela 2.II - Plano de alimentação das larvas de <i>Solea senegalensis</i> para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). A quantidade de alimento está expressa em indivíduos ml ⁻¹ . Rot – Rotíferos, Met Art – Metanáuplios de artémia, Cop – Copépodes, Art Cg – Artémia congelada..... | 18 |
| Tabela 3.I – Percentagem de <i>Vibrionaceae</i> sobre o nº total de bactérias isolado a 7 e 40 DAE para os três tratamentos (A, B e controlo) em larvas de <i>Sparus aurata</i> | 33 |
| Tabela 3.II – Percentagem de <i>Vibrionaceae</i> sobre o nº total de bactérias isolado a 5, 11 e 26 DAE para os três tratamentos (A, B e controlo) em larvas de <i>Solea senegalensis</i> | 37 |
| Tabela 3.III – Peso seco inicial e final do ensaio para os tratamentos com copépodes e controlo..... | 39 |
| Tabela 3.IV - Percentagem de <i>Vibrionaceae</i> no início e no final do ensaio para os tratamentos com copépodes e controlo em juvenis de <i>Solea senegalensis</i> | 43 |

Lista de abreviaturas

DAE – Dias após eclosão

CT – Comprimento total

PS – Peso seco

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

1. Introdução

1.1. Aquacultura no mundo

A aquacultura global expandiu muito nas últimas décadas, tornando-se uma indústria economicamente importante (Subasinghe *et al.*, 2009). Este é um setor alimentar que apresenta uma produção bastante rápida, tendo o potencial de conseguir suprimir as grandes necessidades mundiais de pescado (FAO, 2006). A aquacultura está a expandir-se também em novas direções, diversificando e intensificando as produções já existentes com o objetivo de maximizar a eficiência de produção e otimizar a sua rentabilidade (Denev *et al.*, 2009).

Segundo dados estatísticos da FAO, em 2011 o país que liderou a produção em aquacultura foi a China com 38,6 milhões de toneladas, seguida da Índia, Vietnam e Indonésia. Em suma o continente asiático detém as maiores produções de pescado em aquacultura, sendo a Noruega o maior produtor da Europa com 1,14 milhões de toneladas, o Egipto detém a maior produção de África com 9,87 mil toneladas e por fim, o Chile é o maior produtor da América com 9,55 mil toneladas (FAO, 2013).

De acordo com dados da FAO de 2008, as espécies mais cultivadas são de água doce, sendo que as várias espécies de carpa (família *Cyprinidae*) são as mais produzidas seguidas de ostras (*Crassostrea* spp.), tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), do camarão-branco-do-Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e do salmão do Atlântico (*Salmo salar*), espécie líder na produção intensiva de peixes marinhos (Bostock *et al.*, 2010).

Na Europa a produção de pescado tem-se centrado em espécies como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*). O cultivo do linguado (*Solea senegalensis*) tem vindo a insurgir-se pois esta é uma espécie bem adaptada a águas temperadas e com elevado valor comercial. A sua produção situa-se no sudoeste do Mediterrâneo, em Espanha e Portugal (Dinis *et al.*, 1999)

1.2. Dourada, *Sparus aurata*

1.2.1. Características morfológicas

A dourada apresenta um corpo com forma oval e comprimido lateralmente com uma coloração cinzenta e prateada. O perfil da cabeça é convexo com pequenos olhos,

apresentando uma faixa dourada entre os olhos. O comprimento médio é de 35 cm, podendo atingir até 70 cm (Moretti *et al.*, 1999).

1.2.2. Distribuição geográfica

S. aurata distribui-se geograficamente pelo Mar Mediterrâneo, e ao longo da costa este do Atlântico desde a Grã-Bretanha até ao Senegal, também existe registo da sua presença no Mar Negro, embora com menos frequência (Moretti *et al.*, 1999).



Fig. 1.1 - Distribuição geográfica da dourada, *Sparus aurata*.

1.2.3. Biologia da espécie

O seu habitat é constituído por prados marinhos e também por fundos rochosos ou arenosos. Os indivíduos juvenis permanecem na coluna de água até a uma profundidade de 30m enquanto os adultos podem ser encontrados até 150m de profundidade (Moretti *et al.*, 1999).

Devido aos seus hábitos eurihalinos e euritermais, esta espécie pode ser encontrada em ambientes marinhos e de água salobra como lagoas costeiras e zonas estuarinas, particularmente nas primeiras fases do ciclo de vida (Moretti *et al.*, 1999).

A dourada é um peixe solitário mas também pode viver em pequenos cardumes, alimentando-se maioritariamente de moluscos, crustáceos e pequenos peixes, podendo ser herbívoro facultativo (Moretti *et al.*, 1999).

1.2.4. Reprodução

S. aurata é uma espécie hermafrodita protândrica, ou seja, a maioria dos indivíduos nascem machos, atingindo a maturidade sexual a partir do primeiro ou segundo ano de vida (20-30 cm) e quando atingem um comprimento superior a 30 cm tornam-se fêmeas que são sexualmente maduras aos 2-3 anos (Moretti *et al.*, 1999).

A época reprodutiva da dourada ocorre em mar aberto entre Outubro e Dezembro, podendo estender-se até Fevereiro. As posturas desta espécie são sequenciais pois a maturação das gónadas é progressiva e uma fêmea pode emitir entre 500,000 a 3 milhões de ovos. Os ovos têm cerca de 1mm e contêm uma gota lipídica, flutuando na coluna de água. A eclosão ocorre durante o Inverno e no início da Primavera as larvas migram para zonas costeiras mais protegidas onde a água é temperada e existe alimento em abundância. No final do Outono regressam ao mar aberto onde os indivíduos adultos se voltam a reproduzir (Moretti *et al.*, 1999).

1.2.5. Ciclo de produção de dourada

A dourada é uma das espécies mais cultivadas na Europa, pois apresenta uma elevada adaptabilidade a condições de cultivo intensivas. É cultivada sobretudo nos países circundantes do Mediterrâneo.

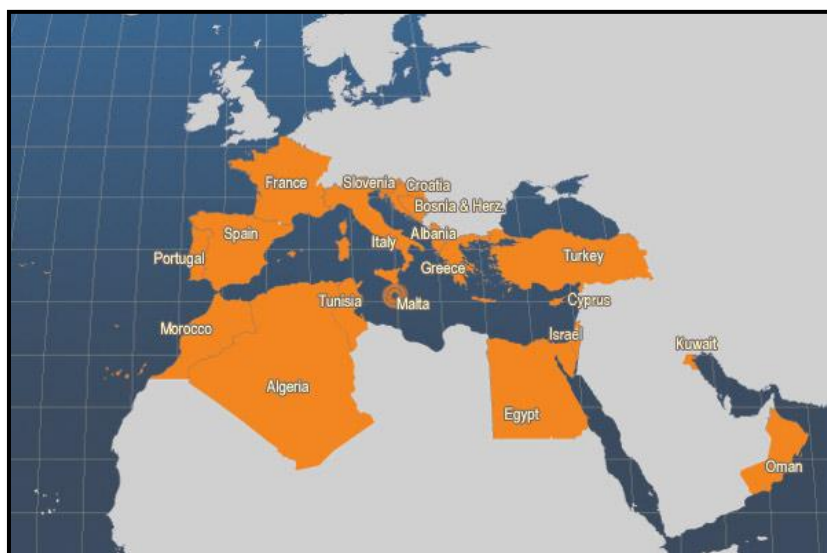


Fig. 1.2 - Principais países produtores de dourada, *Sparus aurata*.

Reprodutores

Os reprodutores podem ser de origem selvagem ou adquiridos de uma aquacultura. No início da época reprodutiva os indivíduos selecionados são transferidos

para os tanques de reprodução para que ocorra a postura. Nesta espécie o controlo do rácio sexual é muito importante uma vez que a reversão sexual é determinada socialmente e é necessário preveni-la nos indivíduos reprodutores. Assim, a presença de fêmeas mais velhas (5 anos) reduz a reversão sexual em machos jovens (1 ano), contribuindo para que o rácio sexual seja mantido (FAO, 2005).

A postura pode ser natural ou induzida com tratamentos hormonais ou manipulação de parâmetros ambientais como o aumento da temperatura ou do fotoperíodo de modo a reproduzir as condições que ocorrem no meio natural. Os ovos são então recolhidos e colocados num tanque de incubação (FAO, 2005).

Cultivo larvar

As instalações de cultivo larvar são designadas por maternidades ou *hatcheries* e existem dois sistemas principais – o de pequena e o de larga escala. O sistema de pequena escala (<10m³) tem por objetivo a produção de um elevado número de juvenis (150-250 L⁻¹), sendo que os parâmetros ambientais são fortemente controlados. Por outro lado, o sistema de larga escala (~200 m³) aproxima-se de um ecossistema natural, garantindo larvas com melhor qualidade mas produzindo um menor número de juvenis (10 L⁻¹) (FAO, 2005).

As larvas de dourada consomem o saco vitelino após 3-4 dias da eclosão. Nesta altura os olhos já são pigmentados e a boca já está aberta de modo a que seja possível a captura das presas vivas, iniciando-se assim a alimentação exógena. O desmame do alimento vivo é feito entre 40 a 60 DAE (dias após eclosão). (FAO, 2005).

O final do período larvar ocorre 70 a 80 DAE, sendo os juvenis transferidos para tanques de pré-engorda (10-25 m³) onde se encontram a densidades que variam entre 3 a 20 kg m⁻³ (FAO, 2005).

Engorda

A dourada pode ser produzida através de três sistemas diferentes: extensivo, semi-intensivo e intensivo, sendo que são a densidade de indivíduos e a fonte de alimento que diferencia estes sistemas. O cultivo extensivo é feito em tanques de terra que são povoados com juvenis capturados do meio natural ou através da entrada passiva destes para dentro dos tanques. Existe pouco ou nenhum controlo dos parâmetros ambientais e a engorda é feita recorrendo ao alimento presente no meio natural. Neste

regime a densidade de cultivo não costuma exceder $0,0025 \text{ kg m}^{-3}$ e levam cerca de 20 meses até atingirem o tamanho comercial (350-400g), sendo que a produção anual deste regime é cerca de $30\text{-}150 \text{ kg ha}^{-1}$ (FAO, 2005).

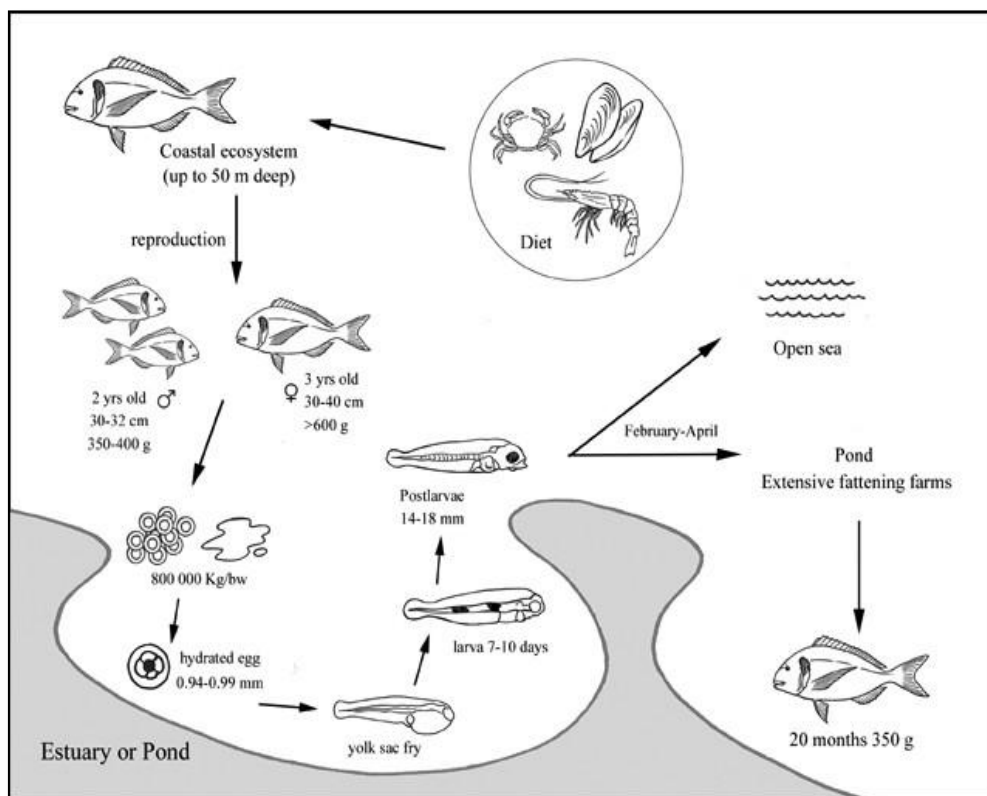


Fig. 1.3 - Ciclo de produção de *Sparus aurata* em regime extensivo.

O regime semi-intensivo já envolve algum controlo por parte dos aquacultores na medida em que os tanques de terra são povoados com juvenis provenientes da pré-engorda e o alimento natural é complementado com ração inerte, verificando-se também um suplemento de oxigénio dissolvido. A densidade de cultivo não excede 1 kg m^{-3} e a produção anual varia entre $500 \text{ e } 2400 \text{ kg ha}^{-1}$ (FAO, 2005).

O sistema intensivo é praticado em tanques de cimento localizados em instalações em terra cujos volumes podem variar entre $200 \text{ e } 3000 \text{ m}^3$, de acordo com o objetivo de produção. Neste regime as densidades de cultivo são bastante elevadas ($15\text{-}45 \text{ kg m}^{-3}$), sendo necessárias injeções massivas de oxigénio para garantir a sobrevivência dos peixes. Em excelentes condições e com temperaturas entre $18^\circ \text{ e } 26^\circ\text{C}$ os juvenis com 5g atingem o tamanho comercial em cerca de um ano. O regime intensivo também pode ter lugar em jaulas marinhas situadas em locais abrigados ou semi-expostos (jaulas flutuantes) ou em locais totalmente expostos no caso das jaulas semi-submersíveis ou submersíveis). Apesar da engorda em jaulas ser feita com menores

densidades (10-15 kg m⁻³), existem diversas vantagens que tornam este método mais rentável, tais como a poupança de energia em bombagem, oxigenação, tratamento dos efluentes, entre outros. Por outro lado, o fato da jaula estar situada no meio natural torna impossível o controlo da temperatura o que resulta num período de crescimento mais longo ou na necessidade de povoar a jaula com juvenis maiores (10g). Deste modo, um juvenil com 5g demora, em média, cerca de 16 meses a atingir o tamanho comercial (FAO, 2005).

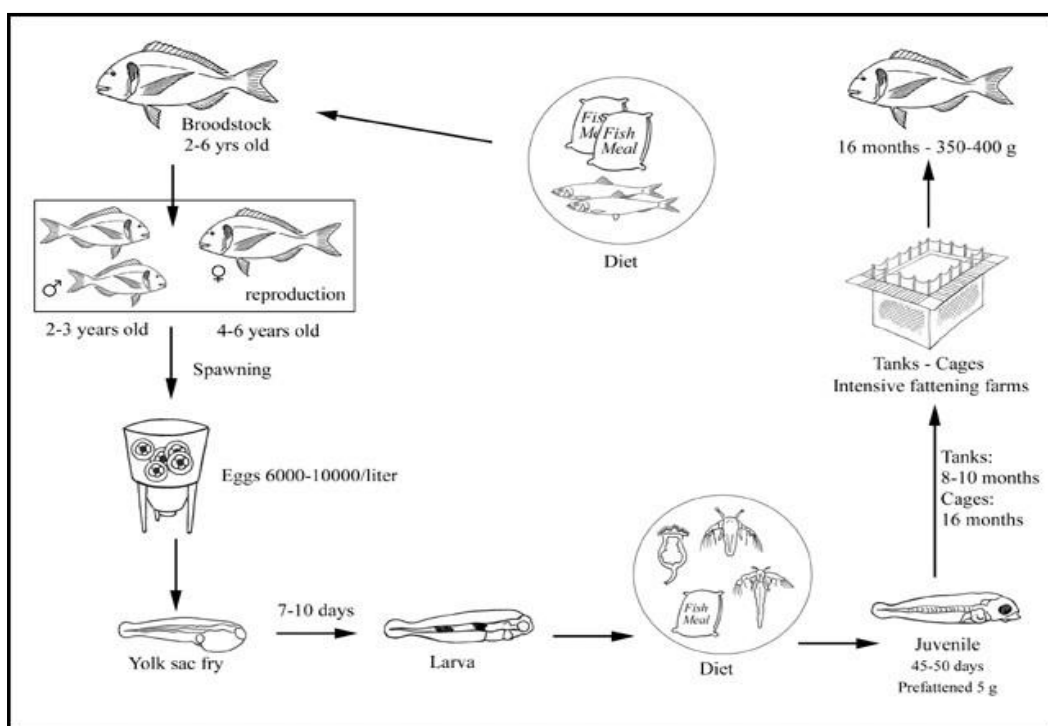


Fig. 1.4 - Ciclo de produção de *Sparus aurata* em regime intensivo.

1.3. Linguado, *Solea senegalensis*

1.3.1. Características morfológicas

O linguado é um peixe plano com um corpo oval e assimétrico pois os olhos situam-se apenas num lado do corpo, normalmente no lado direito. A membrana peitoral apresenta coloração preta e é o que distingue esta espécie do linguado comum, *Solea solea*, que apresenta uma mancha preta no lado posterior da barbatana. O comprimento médio de é 45 cm, podendo atingir os 60 cm (Froese & Pauly, 2011).

1.3.2. Distribuição geográfica

S. senegalensis distribui-se pelo Atlântico desde o golfo de Biscaia até à costa do Senegal, sendo menos frequente no Mediterrâneo oeste (Froese & Pauly, 2011).



Fig. 1.5 - Distribuição geográfica do linguado, *Solea senegalensis*.

1.3.3. Biologia da espécie

S. senegalensis é uma espécie marinha bentónica predominantemente litoral. O seu habitat é constituído por fundos arenosos, vivendo parcialmente enterrados no sedimento, também podem ser encontrados em lagoas de água salobra. Alimentam-se, principalmente à noite, de moluscos, crustáceos e alguns peixes. Podem ser encontrados até 100 m de profundidade (Froese & Pauly, 2011).

1.3.4. Reprodução

O linguado atinge a maturidade sexual aos 3 anos (30 cm) e reproduz-se quando a temperatura atinge 10-12°C que corresponde ao período entre Março e Junho no Atlântico e Mar do Norte e em Fevereiro no Mediterrâneo. Cada fêmea pode emitir entre 100 a 150 mil ovos com cerca de 1 mm. As larvas são pelágicas e, dependendo da temperatura, sofrem a metamorfose cerca de 20 dias após a eclosão, tornando-se bentónicas (Froese & Pauly, 2011).

1.3.5. Ciclo de produção de linguado

S. senegalensis é uma espécie com bastante procura no sul da Europa, sendo cultivada no Mediterrâneo e costa Atlântica por países como Portugal, Espanha e França (Howell *et al.*, 2011).

O cultivo intensivo desta espécie tem ainda alguns problemas associados como o controlo do processo reprodutivo, especialmente em indivíduos nascidos em cativeiro, a incidência de patologias e o desenvolvimento de alimento sustentável para sistemas abertos e de recirculação (Howell *et al.*, 2011). Os surtos de doença desenvolvem-se muito rapidamente causando elevadas mortalidades e, por isso, tem sido enfatizada a necessidade de protocolos de vacinação e o desenvolvimento de vacinas eficazes (autólogas). Contudo, o principal problema que afeta a produção industrial desta espécie reside na falha de produção natural de ovos em cativeiro por parte dos indivíduos da primeira geração (Howell *et al.*, 2011).

Reprodutores

A reprodução desta espécie em cativeiro tem sido estudada desde os anos 80. Contudo as explicações para a diminuta desova da primeira geração (F1) ainda não foram encontradas (Howell *et al.*, 2011).

Esta espécie reproduz-se sazonalmente e a maturação total das gónadas bem como os níveis máximos de esteroides no plasma que ocorrem no início da época reprodutiva são mais elevados nos peixes selvagens do que nos indivíduos F1 (Guzmán *et al.*, 2009).

A temperatura está descrita como o principal fator que desencadeia a maturação sexual, sendo que a postura ocorre de forma natural. Deste modo, é feita a aplicação de flutuações controladas de temperatura para induzir a postura (Howell *et al.*, 2006).

Vários estudos indicam que a falha reprodutiva em cativeiro não está relacionada com disfunções hormonais. Porém, foi verificada uma falha nos machos F1 de demonstrarem um comportamento de acasalamento normal. Demonstrou-se também que as fêmeas F1 produzem ovos fertilizados através de postura natural quando estão na presença de machos selvagens (Carazo *et al.*, 2011).

Cultivo larvar

As larvas desta espécie consomem o saco vitelino após 2-3 dias da eclosão, o que coincide com a abertura da boca. Nesta altura é iniciada a alimentação exógena (Dinis *et al.*, 2000).

Após a eclosão as larvas de linguado são pelágicas. Aos 11 DAE inicia-se a metamorfose em que ocorre a migração do olho e a modificação do esqueleto cefálico, ou seja, a mudança do plano no lado do corpo que está em contato com o fundo), o final da fase larvar acompanha o final da metamorfose que termina aos 20 DAE, quando as larvas se tornam bentónicas (Dinis *et al.*, 2000).

As larvas bentónicas são transferidas dos tanques cilindro-cónicos para tanques de fundo raso. O desmame do alimento vivo é feito a partir de 40 DAE. (Dinis *et al.*, 2000).

Engorda

A engorda de linguado pode ser feita em tanques de terra ou de cimento ou em *raceways*. A produção pode ser em regime extensivo, semi-intensivo e intensivo. Contudo, estudos demonstram que esta espécie é um pouco menos adequada para produzir a elevadas densidades de cultivo devido ao seu comportamento alimentar uma vez que está adaptada a uma alimentação em pequenas quantidades mas com elevada frequência (Imsland *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2010). Deste modo, o cultivo desta espécie é feita com densidades inferiores a 10 kg m⁻². O tamanho comercial, a partir de 125g, é atingido após 18-24 meses para juvenis com 5 g (Howell, 1997).

1.4. Alimentação

Em aquacultura uma alimentação adequada é muito importante pois está diretamente ligada com o crescimento ótimo, a manutenção de um estado sanitário adequado e uma boa qualidade final das espécies cultivadas. Deste modo, devem ser conhecidas as bases fisiológicas da nutrição (processos de digestão e metabolismo e necessidades nutritivas) e os aspetos práticos relativos à composição dos alimentos, dos sistemas de alimentação e a avaliação da eficácia nutritiva (Volkoff *et al.*, 2010).

1.4.1. Alimentação larvar

Após a eclosão, as larvas alimentam-se das suas reservas vitelinas durante um curto período de tempo, dependendo da espécie, sendo que tem que ser iniciada uma alimentação exógena após o consumo das reservas energéticas, no caso da dourada esta inicia-se 3-4 dias após a eclosão e no linguado a alimentação exógena tem lugar 2-3 dias após a eclosão. Para que as larvas se alimentem é necessário ter em conta o tamanho da abertura das suas bocas e deste modo, oferecer a presa com o tamanho mais adequado. A primeira alimentação exógena é um momento decisivo caracterizado por elevada mortalidade que, no meio natural, está relacionada com a privação de alimento após o esgotamento das reservas vitelinas e, em cativeiro, com o fornecimento de alimento com qualidades inapropriadas e técnicas inadequadas de alimentação (Busch, 1996).

O alimento vivo *standard* é composto por microalgas, rotíferos e artémia, dependendo da espécie cultivada e das suas necessidades nutricionais. Assim, é necessária a produção de uma cadeia trófica adequada ao seu consumo diário pelas larvas. O início da alimentação é feito com rotíferos, *Brachionus rotundiformis* (estirpe pequena) ou *B. plicatilis* (estirpe maior), dependendo da espécie cultivada. Devido a esta elevada disponibilidade de presas nos tanques, é usual utilizar a técnica da água verde em que se fornece uma mistura de microalgas concentrada de modo a manter o valor nutritivo das presas e a qualidade da água (Ferreira, 2009). Com o desenvolvimento das larvas, o tamanho da boca aumenta e torna-se necessária a oferta de presas maiores tal como os náuplios de artémia. Estes podem ser utilizados logo após a eclosão quando o seu valor energético é maior ou então podem ser enriquecidos, neste caso oferecem-se náuplios com mais horas de incubação. A terceira fase de alimentação é composta por metanáuplios de artémia enriquecidos que, por apresentarem um tamanho maior, se adequam às larvas em constante crescimento. Após o final do período larvar inicia-se o desmame do alimento vivo em que se dá uma dieta de arranque que se caracteriza por ser húmida e conter elevados níveis proteicos (50-60%), sendo depois introduzida, progressivamente, a dieta inerte (FAO, 2005).

À parte dos rotíferos e da artémia, têm sido feitos esforços para tentar introduzir os cultivos de copépodes na alimentação larvar. Os copépodes caracterizam-se por terem uma gama de tamanhos muito variada, desde os náuplios até aos adultos e apresentam o típico movimento que estimula a atividade predatória das larvas. Estes micro-crustáceos apresentam um perfil nutricional mais adequado na medida em que

possuem um elevado conteúdo de ácidos gordos de cadeia longa altamente insaturados (HUFAs) da série n-3 como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) que são cruciais para a sobrevivência, desenvolvimento e resistência ao *stress* (Delbare *et al.*, 1996). Outra vantagem dos copépodes é o fato do seu tempo de retenção no aparelho digestivo das larvas ser maior que o da artémia, ou seja, este tempo de retenção mais elevado garante uma melhor digestão e, conseqüentemente, uma melhor absorção dos nutrientes por parte das larvas (Pedersen *et al.*, 1989).

Sendo que o cultivo larvar está fortemente dependente de uma fonte de alimento vivo, existem algumas desvantagens associadas à sua produção como o elevado custo da manutenção destes cultivos auxiliares e a probabilidade de ocorrência de um *crash* dos mesmos devido a infecções bacterianas ou virais que interrompem o fornecimento de alimento e aumentam o risco de doença nos organismos cultivados (Ferreira, 2009). Assim, para tentar colmatar estes constrangimentos têm sido feitos esforços para criar outras alternativas como o desenvolvimento de dietas artificiais.

O uso de copépodes na larvicultura de peixes tem-se centrado nas espécies calanóides como *Acartia* sp. (Schipp *et al.*, 1999), *Eurytemora* sp. (Shields *et al.*, 1999), *Parvocalanus* sp. e *Centropages typicus* (Olivotto *et al.*, 2008) e nas espécies harpaticóides como *Euterpina acutifrons*, *Tisbe* sp. (Kahan *et al.*, 1982) e *Tigriopus japonicus* (Fukusho, 1980).

Contudo, ainda existem algumas barreiras no cultivo destes micro-crustáceos em larga escala, o que ainda não permitiu que os copépodes sejam uma alternativa aos rotíferos ou à artémia (Ferreira, 2009).

Na fase do desmame do alimento vivo, os copépodes também constituem uma alternativa à dieta de arranque, uma vez que têm sido desenvolvidas tecnologias para a sua preservação, mantendo as características nutricionais. E, por esta razão, os copépodes preservados são considerados uma fonte de ácidos gordos essenciais (HUFAs), que são cruciais para a melhoria da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento larvar, metabolismo lipídico e metamorfose. E, conseqüentemente, o crescimento larvar torna-se mais rápido, tornando a fase larvar mais curta (Olivotto *et al.*, 2010).

1.4.2. Alimentação de peixes adultos

No que diz respeito à alimentação de indivíduos adultos, esta deve ser feita tendo em conta os requerimentos nutricionais da espécie cultivada de modo a otimizar o crescimento e as qualidades organolépticas do peixe. A dieta de engorda deve suprimir os níveis energéticos necessários que, por sua vez, dependem do peso do indivíduo e da temperatura ambiental (Lupatsch & Kissil, 2003).

As dietas com melhores resultados são as que contêm uma elevada percentagem de farinha de peixe. No entanto, esta fonte de proteína não é sustentável e, por isso, têm sido feitos estudos de modo a substituir uma parte desta por proteína vegetal de modo a diminuir o impacto ambiental e a tornar a aquacultura uma atividade sustentável. Na dourada, *Sparus aurata*, é possível substituir até 40% da proteína animal por vegetal, utilizando farinha de soja (Nengas *et al.*, 1996).

1.5. Microbiota do trato digestivo dos peixes

O trato digestivo dos peixes representa a interface entre o ambiente exterior e interior do corpo e a sua complexa ecologia microbológica interage com o ambiente interior e exterior, tendo uma importante influência na saúde e na resistência a doenças. O intestino é um órgão complexo e multifuncional, isto é, para além da digestão e absorção de nutrientes, também tem um papel decisivo no equilíbrio osmótico e dos eletrólitos, na regulação endócrina da digestão, metabolismo e imunidade dos peixes (Austin, 2006; Denev *et al.*, 2009).

A microbiota do trato digestivo dos peixes marinhos e de água doce apresenta uma grande variedade, sendo que as populações microbianas presentes neste trato estão em maior número do que as presentes na água. Este fato indica que o intestino proporciona nichos ecológicos favoráveis a estes microrganismos. A microflora intestinal é caracterizada por uma elevada densidade e diversidade, sendo que as bactérias são o grupo dominante (Denev *et al.*, 2009). A comunidade microbiana do trato digestivo de peixes marinhos é maioritariamente composta por bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, sendo os géneros mais comuns *Vibrio* e *Aeromonas* (Clements, 1997).

O trato digestivo dos peixes é colonizado na fase larvar e a microflora primária é temporária pois desenvolver-se-á para uma microflora permanente no estado juvenil ou após a metamorfose (Grisez *et al.*, 1996). Nesta fase, atinge-se um equilíbrio entre as

espécies bacterianas residentes no trato digestivo, o que é crucial para a resistência natural contra infecções por parte dos peixes (Denev *et al.*, 2009).

Têm sido feitos estudos da microflora do trato digestivo através de métodos tradicionais dependentes do cultivo de bactérias e a identificação das mesmas feita através das suas características fenotípicas e bioquímicas. Contudo, estudos feitos noutras espécies sugerem que apenas uma pequena percentagem da comunidade bacteriana total é recuperada pelos métodos de cultivo tradicionais. Desta forma, os métodos moleculares que envolvem a extração e análise de ADN diretamente das amostras são mais vantajosos na medida em que permitem a caracterização e a quantificação da microflora intestinal, fornecendo também uma classificação esquemática de modo a construir relações filogenéticas (Zoetendal *et al.*, 2004). Um dos métodos mais utilizados é o PCR-DGGE (*Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), sendo considerada uma técnica fiável, rápida e sensível para os estudos da diversidade microbiológica (Brunvold *et al.*, 2007). Assim, este método possibilitou uma melhor compreensão das relações entre bactérias e entre bactéria-hospedeiro tanto na saúde como na doença como também aumentou o potencial de manipulação da microbiota intestinal dos peixes através de fatores nutricionais e ambientais (Denev *et al.*, 2009).

1.6. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a análise do impacto que a alimentação, com e sem copépodes, tem no crescimento, sobrevivência e na microflora do trato digestivo em larvas de dourada (*Sparus aurata*) e em larvas e juvenis de linguado (*Solea senegalensis*).

2. Material e métodos

2.1. Ensaios larvares de dourada e linguado: alimentação com copépodes

2.1.1. Peixes e condições de cultivo

2.1.1.1. Larvas de dourada

Os ovos de dourada, *Sparus aurata*, foram obtidos através de postura natural de um *stock* de reprodutores mantidos em cativeiro nas instalações do IPMA (Olhão, Portugal). A incubação foi feita em tanques cilindro-cónicos de 200L com água salgada filtrada a 18°C durante um período de 48h.

As larvas recém-eclodidas foram transferidas para cada um dos nove tanques cilindro-cónicos de 200L com água salgada filtrada a uma densidade inicial de 80 larvas L⁻¹. O ensaio decorreu num sistema aberto com um fluxo de água contínuo que variou entre 0,3 L min⁻¹ (0 aos 11 DAE), 1,0 L min⁻¹ (12 aos 14 DAE) e 1,2 L min⁻¹ (14 aos 40 DAE) e um fotoperíodo de 14h luz:10h escuridão. O valor médio de oxigénio dissolvido foi 7,6 ± 0,6 mg L⁻¹ (80,7 ± 6,6% de saturação), a temperatura média foi de 18,1 ± 0,6°C, salinidade a 35 e um pH de 8,2. Os tanques foram limpos diariamente a partir do 3º dia após eclosão (DAE) e foram removidas as larvas mortas através de purgas.

2.1.1.2. Larvas de linguado

Os ovos de linguado, *Solea senegalensis*, foram obtidos através de postura natural de um *stock* de reprodutores mantidos em cativeiro nas instalações do IPMA (Olhão, Portugal). A incubação foi feita em tanques cilindro-cónicos de 200L com água salgada filtrada a 18°C durante um período de 48h.

As larvas com 2 DAE foram transferidas para cada um dos nove tanques cilindro-cónicos de 300L com água salgada filtrada a uma densidade inicial de 13 larvas L⁻¹. O ensaio decorreu num sistema aberto com um fluxo de água contínuo que variou entre 0,5 L min⁻¹ (2 aos 14 DAE), 1,2 L min⁻¹ (15 aos 16 DAE), 1L min⁻¹ (17 aos 25 DAE) e 1,4 L min⁻¹ (26 aos 27 DAE) e um fotoperíodo de 14h luz:10h escuridão. O valor médio de oxigénio dissolvido foi 8,4 ± 1,1 mg L⁻¹ (89,2 ± 11,4% de saturação), a temperatura média foi de 18,5 ± 0,2°C, salinidade a 35 e um pH de 8,2. Os tanques foram limpos diariamente

a partir do 3º dia após eclosão (DAE) e a remoção das larvas mortas feita através de purgas.

2.1.2. *Design experimental*

2.1.2.1. Larvas de dourada

As larvas de dourada foram divididas em três grupos experimentais:

A – este grupo teve um regime de co-alimentação em que as larvas foram alimentadas 50% com presas vivas e 50% com copépodes preservados, de acordo com as quantidades descritas nos protocolos *standard* de alimento vivo e de alimento composto por partículas inertes;

B – a este grupo foi fornecido alimento vivo até 25 DAE que foi 20% substituído pelos copépodes preservados a 8 DAE, esta percentagem aumentou progressivamente até 100% a 26 DAE;

Controlo – este grupo foi alimentado apenas com presas vivas de acordo com o protocolo *standard* de alimentação larvar.

Cada tratamento foi feito em triplicado e o ensaio teve a duração de 40 dias.

Os três grupos experimentais foram alimentados de acordo com o seguinte plano alimentar:

Tabela 2.1 - Plano de alimentação das larvas de *Sparus aurata* para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). A quantidade de alimento está expressa em indivíduos ml^{-1} . Rot – Rotíferos, N Art – Náuplios de artémia (AF, VNBS, Vinh Chau, Vietnam), Met Art – Metanáuplios de artémia (EG, Aquafeed Premium, Great Salt Lake, USA), Cop – Copépodes

| | A | | | | B | | C | | |
|-------|-----|-------|-----------|------|-----|---------|------|-------|---------|
| DAE | Rot | N Art | Met Art | Cop | Rot | Cop | Rot | N Art | Met Art |
| 4 -7 | 5 | | | | 5 | | 5 | | |
| 8-14 | 5 | | | 1-3 | 5 | 0,6-1,2 | 6-10 | | |
| 15-25 | 5 | 0,3 | | 5-12 | 4-8 | 2-18 | 10-5 | 0,6 | |
| 26-40 | | | 0,5 - 2,5 | 14-6 | | 18-12 | | | 1-5 |

Até 8 DAE todos os tratamentos foram alimentados de igual forma. Para os grupos A e B, em todas as alimentações foram fornecidos primeiro os copépodes preservados, antes do alimento vivo, para tentar garantir que as larvas os ingeriam, dado que eram um alimento inerte e, passado um período de tempo, afundavam na coluna de água.

A todos os tratamentos foram adicionadas algas (*Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*) diariamente a um volume de 1-2L.

2.1.2.2. Larvas de linguado

As larvas de linguado foram divididas em três grupos experimentais:

A – este grupo teve um regime de co-alimentação em que as larvas foram alimentadas 50% com presas vivas e 50% com copépodes preservados até 20 DAE, de seguida, até 27 DAE foram alimentados apenas com copépodes preservados de acordo com as quantidades descritas nos protocolos *standard* de alimento vivo e de alimento composto por partículas inertes;

B – este grupo foi alimentado com alimento vivo desde 2 até 18 DAE que foi 20% substituído pelos copépodes preservados a 6 DAE, esta percentagem aumentou progressivamente para 40% a 12 DAE, 80% a 15 DAE e 100% a 19DAE;

Controlo – este grupo foi alimentado com presas vivas desde 2 até 19 DAE e até 27 DAE foi dada artémia congelada de acordo com o protocolo *standard* de alimentação larvar.

Cada tratamento foi feito em triplicado e o ensaio teve a duração de 27 dias.

Os três grupos experimentais foram alimentados de acordo com o seguinte plano alimentar:

Tabela 2.II - Plano de alimentação das larvas de *Solea senegalensis* para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo). A quantidade de alimento está expressa em indivíduos ml⁻¹. Rot – Rotíferos, Met Art – Metanúplios de artémia, Cop – Copépodes, Art Cg – Artémia congelada

| | A | | | B | | | C | | |
|-------|------|----------|---------|------|---------|---------|------|---------|--------|
| DAE | Rot | Met Art | Cop | Rot | Met Art | Cop | Rot | Met Art | Art Cg |
| 2-5 | 4-8 | | | 4-8 | | | 4-8 | | |
| 6-10 | 10-5 | 0,25-0,5 | 1,5-0,7 | 10-5 | 0,4-0,6 | 0,6 | 10-5 | 0,5-1 | |
| 11-18 | | 0,3-0,5 | 0,6-0,8 | | 0,4-0,2 | 0,5-1,3 | | 0,6-1 | |
| 19-27 | | | 1-0,6 | | | 1-0,6 | | 1 | 1-2,2 |

2.1.3. Cultura de microalgas

Nannochloropsis oculata e *Isochrysis galbana* usadas durante o cultivo larvar foram produzidas de acordo com o protocolo *standard* descrito por FAO (1996). Foram produzidos grandes volumes de cultura, a partir de uma cultura *stock*, em mangas de polietileno com um volume de 100L de água salgada estéril enriquecida com meio F2 a

uma densidade de $2-4 \times 10^7$ células ml^{-1} numa sala com temperatura estável de 25°C e 24h de luz.

2.1.4. Enriquecimento de rotíferos e de metanúplios de artémia

Os rotíferos foram enriquecidos com *Red Pepper*® (BernAqua, Belgium) em água salgada a 25°C a uma densidade de 5×10^5 indivíduos L^{-1} , 12h antes de serem recolhidos para alimentar as larvas.

Relativamente à artémia, os náuplios foram fornecidos às larvas logo após a sua eclosão dos cistos. Quanto aos metanúplios, após a eclosão, foram transferidos para um tanque com arejamento e água salgada a $25-30^\circ\text{C}$ a uma densidade de 3×10^5 indivíduos L^{-1} , sendo enriquecidos com *Red Pepper*® (BernAqua, Belgium) 24h antes de serem administrados às larvas. Após a recolha dos indivíduos fez-se uma lavagem para remover quaisquer vestígios do meio de enriquecimento. No caso dos metanúplios de artémia congelados, após o seu enriquecimento foram recolhidos e congelados a -20°C e 15 min antes de serem oferecidos às larvas eram postos a descongelar em água salgada.

2.1.5. Copépodes preservados

Os copépodes preservados foram oferecidos às larvas de acordo com a sua classe de tamanhos. Para as larvas de dourada foi fornecida a classe 100-200 μm desde 8 até 26 DAE, introduziu-se a classe 200-300 μm a 20 DAE até ao final do ensaio e, por fim, a classe de 300-400 μm foi adicionada a 32 DAE até ao fim do ensaio. Para as larvas de linguado iniciou-se com a classe 100-200 μm a 6 DAE até 9 DAE, a classe 200-300 μm introduziu-se a 10 até 14 DAE, a 14 DAE iniciou-se a classe 300-400 μm até 22 DAE e, por fim, a classe 400-500 μm foi oferecida a 22 DAE até ao final do ensaio.

Os copépodes estavam preservados em embalagens de alumínio que, depois de abertos, eram conservados no frigorífico a 4°C . Antes de se oferecerem às larvas eram lavados em água salgada durante 2 minutos e depois agitados numa garrafa de 0,5L de modo a quebrar os aglomerados de indivíduos.

2.1.6. Análise microbiológica

Para a microbiologia do trato digestivo das larvas de dourada fizeram-se dois pontos de amostragem, a 7 e 40 DAE, antes da introdução dos copépodes e no final do ensaio, respetivamente. Nas larvas de linguado fizeram-se três pontos de amostragem, a

5, 11 e 26 DAE, antes da introdução dos copépodes, antes da metamorfose e depois da metamorfose que coincidiu com o final do ensaio, respetivamente (Fig. 2.1).

Na primeira amostragem para ambos os ensaios foi recolhido um *pool* de 9 larvas de todos os tratamentos (uma larva por tanque). No ensaio das larvas de dourada para o segundo ponto de amostragem (40 DAE) foram recolhidas 30 larvas por tratamento (dez larvas por tanque), de acordo com o procedimento descrito por [Makridis et al., \(2000\)](#). No ensaio das larvas de linguado foram recolhidas 30 larvas a 11 DAE (antes da metamorfose) e 10 larvas por tratamento a 26 DAE (depois da metamorfose).

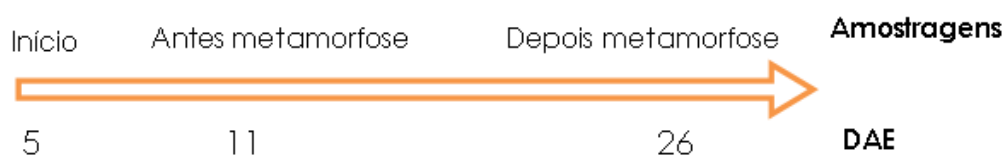


Fig. 2.1 - Amostragens microbiológicas do ensaio das larvas de *Solea senegalensis*.

Em ambos os ensaios as larvas foram primeiramente desinfetadas com cloreto de benzalcónio (0.1% w/v) durante 30 segundos, lavadas com solução salina estéril e homogeneizadas em 2 ml de solução salina estéril. Foram feitas diluições decimais do homogeneizado e uma alíquota de 100µl foi inoculada em meio *trypticase soy agar* (TSA) e em meio *thiosulfate citrate bile* (TCBS). Nos meios TSA e TCBS, para ambos os ensaios, foram inoculadas as diluições decimais de 10^0 a 10^{-3} e 10^0 a 10^{-2} , respetivamente. Apenas na última amostragem do ensaio das larvas de linguado foram inoculadas as diluições de 10^{-2} a 10^{-4} em meio TSA. As placas dos dois meios foram incubadas a 23°C e o número de colónias bacterianas foi contado 48h e 7 dias depois da inoculação das placas.

Em cada ponto de amostragem de microbiologia escolheram-se as colónias mais representativas. Estas foram isoladas numa nova placa de TSA através da repicagem com uma ansa. Após o isolamento das colónias, a identificação foi feita através de testes bioquímicos (Gram, oxidase e catalase), seguindo os critérios propostos por [Buller, \(2004\)](#), e de galerias API 20NE e 20E (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.7. Análise morfométrica

Para a morfometria, as larvas de dourada foram amostradas a 0, 3, 8, 14, 20, 32 e 42 DAE e o comprimento total (CT) e a altura do miótomo (AM) foram registados. Para 0 e 3 DAE foi amostrado um *pool* de 30 larvas, no dia 8 DAE retiraram-se 30 larvas por tratamento e nos restantes dias de amostragem analisaram-se 60 larvas por tratamento. Relativamente ao peso seco no dia 0 e 3 DAE retirou-se um *pool* de 30 larvas, ao dia 8 após eclosão retirou-se um *pool* de 90 larvas e nos restantes dias de amostragem recolheram-se 60 larvas por tratamento.

As larvas de linguado foram amostradas a 5, 10, 18 e 27 DAE e foi registado apenas o comprimento total (CT). A 5 DAE foram medidas 15 larvas por tratamento, a 10 e 18 DAE foram amostradas 45 larvas por tratamento e na amostragem final, a 27 DAE, foram medidas 50 larvas por tratamento. Para a análise do peso seco (PS) a 5 DAE retirou-se um *pool* de 45 larvas dos três tratamentos, a 10 DAE retiraram-se 45 por tratamento, a 18 DAE recolheu-se uma amostra de 63 larvas por tratamento e, por fim, a 27 DAE retirou-se uma amostra de 60 larvas por tratamento.

Em ambos os ensaios, o comprimento total e a altura do miótomo foram medidos através de um microscópio (Body STMI, 2000C). Para a análise do peso seco as larvas foram primeiramente lavadas com água destilada, congeladas em azoto líquido a -80°C e, de seguida, foram liofilizadas através de um liofilizador (Telstar, LyoQuest). O peso seco foi registado através de uma balança (Sartorius Pro 11) com uma precisão de $1\ \mu\text{g}$.

2.2. Ensaio de alimentação com copépodes em juvenis de linguado

2.2.1. Peixes e condições de cultivo

Os juvenis de linguado, *Solea senegalensis*, com 59 DAE foram cedidos pela Universidade do Algarve, sendo transferidos para as instalações do IPMA (Olhão, Portugal) onde decorreu o ensaio.

Os juvenis foram transferidos para cada um dos seis tanques retangulares de fibra de vidro (70 cm comprimento x 45 cm largura x 12 cm altura) com um volume de 35L contendo água salgada e foram aclimatizadas durante 16 dias. O ensaio decorreu com uma densidade inicial de aproximadamente $9\ \text{juvenis L}^{-1}$ num sistema aberto com um fluxo de água contínuo de $0,75\ \text{L min}^{-1}$ até 130 DAE e de $1\ \text{L min}^{-1}$ nos últimos 5 dias do

ensaio. Foi mantido um fotoperíodo de 11h luz:13h escuridão, o valor médio de oxigénio dissolvido foi de $7,8 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ($83,3 \pm 7,8 \%$ de saturação), a temperatura média foi de $18,4 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade a 35 e um pH de 8,2. O protocolo alimentar foi o seguinte: os juvenis eram alimentados quatro vezes por dia, às 10h, 14h, 15h30 e 17h30 com 30, 10, 20 e 40%, respetivamente do total de alimento dado por dia. Os tanques foram limpos diariamente sendo removidos os indivíduos mortos antes da primeira alimentação. Foi feita também uma purga diária pela tarde, entre a 3ª e a 4ª alimentação.

2.2.2. Design experimental

Os juvenis de linguado foram divididos em dois grupos experimentais, o grupo copépodes que foi alimentado com uma ração que continha 10% de copépodes e o grupo controlo em que os peixes foram alimentados com uma ração controlo (Gemma Diamond, Sparos) utilizada para o cultivo de peixes marinhos. Ambos os tratamentos foram feitos em triplicado e o ensaio teve a duração de 60 dias.

2.2.3. Análise microbiológica

Para a microbiologia do trato digestivo fizeram-se dois pontos de amostragem, um no início do ensaio, antes da introdução da ração com copépodes e outro no final do ensaio, após 60 dias deste ter começado, tendo os juvenis 135 DAE.

Na primeira amostragem foi recolhido um *pool* de 12 juvenis de ambos os tratamentos (dois peixes por tanque). Os juvenis foram primeiramente desinfetadas com cloreto de benzalcónio (0.1% w/v) durante 30 segundos, lavados com solução salina estéril e a zona abdominal foi retirada e homogeneizada em 2 ml de solução salina estéril. Foram feitas diluições decimais do homogeneizado e uma alíquota de 100µl foi inoculada em meio TSA (10^{-1} a 10^{-4}) e em meio TCBS (10^0 a 10^{-3}). As placas dos dois meios foram incubadas a 23°C e o número de colónias foi contado 48h e 7 dias depois da inoculação das placas.

No segundo ponto de amostragem foram recolhidos 15 juvenis de cada tratamento (cinco peixes por tanque). A superfície dos peixes foi desinfetada com álcool e foi retirado o intestino, medindo-se o comprimento total e o pH com uma sonda (Eutech Instruments, Oakton ®). Por cada tanque, os intestinos de cinco peixes foram homogeneizados em 2 ml de solução salina estéril. Foram feitas diluições decimais do homogeneizado e uma alíquota de 100µl foi inoculada em meio TSA (10^{-2} a 10^{-5}) e em

meio TCBS (10^{-2} a 10^{-4}). As placas dos dois meios foram incubadas a 23°C e o número de colônias foi contado 48h e 7 dias depois da inoculação das placas.

Em cada ponto de amostragem de microbiologia foram isoladas colônias bacterianas representativas e a identificação foi feita através de testes bioquímicos (Gram, oxidase e catalase), seguindo os critérios propostos por Buller, (2004), e de galerias API 20NE e 20E (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.4. Análise morfométrica

Para o comprimento total (CT) e peso húmido foram amostrados 90 juvenis por tratamento a cada 20 dias do ensaio (três pontos de amostragem). Adicionalmente, para o peso húmido, foram amostrados 30 juvenis por tratamento nos dias 16, 30 e 50 do ensaio para ajustar a quantidade de ração. Para determinar o peso seco (PS) foram retirados 30 peixes de cada tratamento na primeira e última amostragem, estes foram lavados com água destilada, congelados em azoto líquido a -80°C e liofilizados através de um liofilizador (Telstar LyoQuest). O peso seco foi registado através de uma balança (Sartorius Pro 11) com uma precisão de 1 µg e o peso húmido foi registado através de uma balança (Kern EG620) com uma precisão de 0,1 g.

2.3. Análise estatística

Os dados relativos aos ensaios de alimentação em larvas de dourada e linguado foram analisados através de uma Análise de Variância (ANOVA) de um fator. Todos os pressupostos (nomeadamente normalidade e homoscedasticidade da amostra) inerentes à realização do método foram devidamente validados. Contudo, sempre que estes foram violados, a análise realizou-se mediante o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* (Zar, 2009). No que concerne aos dados provenientes do ensaio de alimentação em juvenis de linguado foi feita uma análise através de uma ANOVA de um fator. De igual modo se procedeu à validação dos pressupostos que lhe estão inerentes. Sempre que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, o teste de comparações múltiplas de *Bonferroni* foi efetuado, por forma a evidenciar onde se detetam as ditas diferenças (Zar, 2009). Todas as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 5% (isto é, para *p-value* < 0,05). Todos os resultados estão expressos

sob a forma de média \pm desvio-padrão. Todos os cálculos inerentes aos resultados alcançados foram realizados com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics 20.

3. Resultados

3.1. Ensaio larvares de alimentação com copépodes em dourada e linguado

3.1.1. Crescimento e sobrevivência larvar

3.1.1.1. Larvas de dourada

No início do ensaio o comprimento total (CT) larvar foi de $3,8 \pm 0,3$ mm. No intervalo entre 8 e 42 DAE, as larvas dos grupos A e controlo quadruplicaram o seu comprimento para $15,2 \pm 1,2$ e $15,1 \pm 1,2$ mm, respetivamente. Enquanto no grupo B o comprimento apenas triplicou para $11,8 \pm 2,1$ mm. Os tratamentos A e controlo apresentam comprimentos significativamente maiores que o grupo B a partir de 20 DAE, sendo que o grupo controlo apresenta o comprimento médio mais alto de $6,6 \pm 0,6$ e $10,5 \pm 1,1$ mm para 20 e 32 DAE, respetivamente e o grupo A apresenta o comprimento médio mais alto de $15,2 \pm 1,3$ mm para 42 DAE (Fig. 3.1).

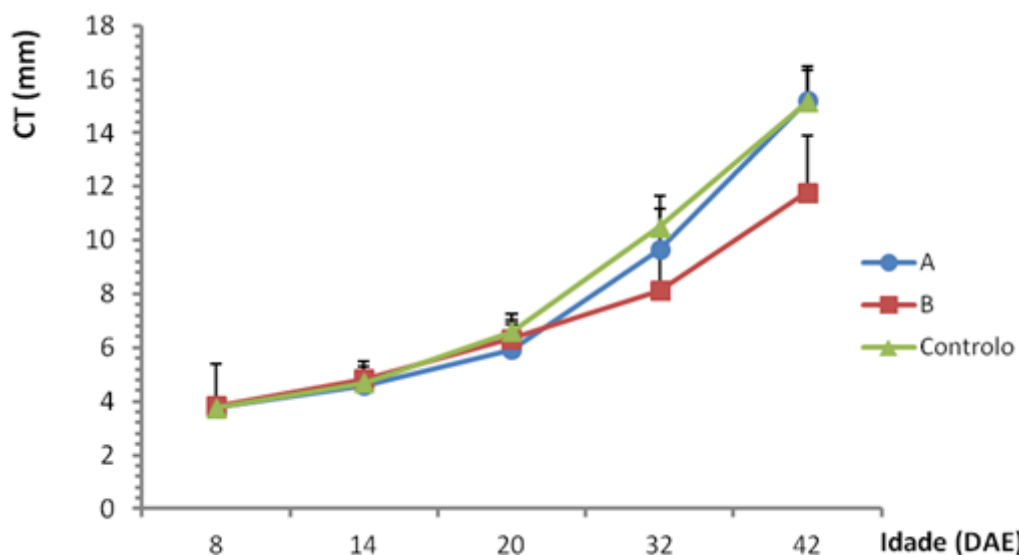


Fig. 3.1 - Crescimento em comprimento total (CT) de larvas de *Sparus aurata* para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo).

Relativamente ao peso seco (PS) este foi de $27,3 \pm 5,5$ μg larva⁻¹ no início do ensaio (0 DAE). A 14 DAE, os tratamentos B e controlo exibiram pesos significativamente maiores, sendo o valor do grupo B mais elevado com $58,2 \pm 4,9$ μg larva⁻¹. A 20 DAE não se verificou diferenças significativas entre os três grupos. A 32 DAE o grupo controlo

apresentou um peso médio significativamente maior que o tratamento B com $903,4 \pm 353,3 \mu\text{g larva}^{-1}$. No final do ensaio (42 DAE) os tratamentos A e controlo apresentaram um peso médio significativamente maior, sendo que o grupo controlo exibiu um valor maior com $3596,8 \pm 534,0 \mu\text{g larva}^{-1}$ (Fig. 3.2).

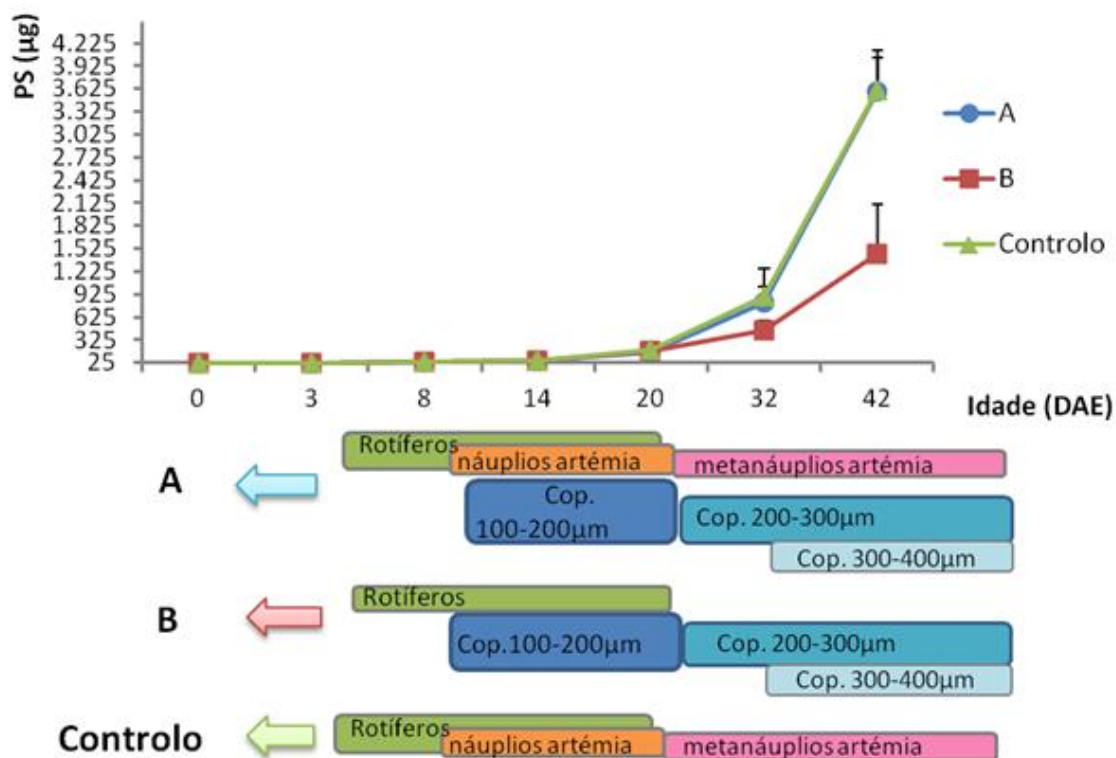


Fig. 3.2 - Crescimento em peso seco (PS) de larvas de *Sparus aurata* e plano alimentar para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo).

No que diz respeito à sobrevivência, houve um decréscimo acentuado desde o dia 5 até ao 14 DAE, havendo depois uma estabilização a partir de 20 DAE até ao final do ensaio (41 DAE). Esta tendência foi igual para os três tratamentos, não havendo diferenças significativas entre estes. Os valores da sobrevivência no final do ensaio foram de $5,0 \pm 4,5$, $1,1 \pm 1,3$ e $3,3 \pm 2,2$ % para os grupos A, B e controlo, respetivamente (Fig. 3.3).

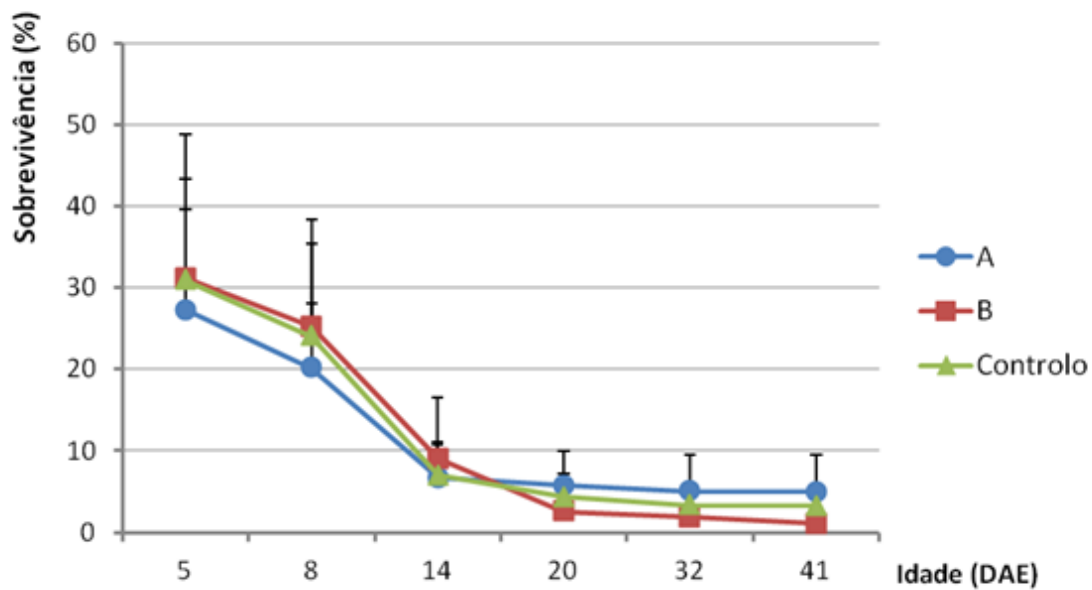


Fig. 3.3- Sobrevivência larvar de *Sparus aurata* para os três tratamentos: A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo).

3.1.1.2. Larvas de linguado

No início do ensaio o comprimento total larvar foi de $4,4 \pm 0,2$ mm. A 10 DAE os grupo controlo e B exibiram um comprimento médio significativamente maior ($6,2 \pm 0,3$ mm para ambos) que o grupo A com $6,0 \pm 0,3$ mm. A 18 DAE o grupo controlo apresentou um comprimento total significativamente maior com $8,5 \pm 0,7$ mm, os grupos A e B registaram um comprimento total de $7,4 \pm 0,7$ e $7,2 \pm 0,7$ mm, respetivamente. No final do ensaio, correspondente a 27 DAE, as larvas apresentaram comprimentos de $9,6 \pm 0,7$, $7,4 \pm 0,7$ e $7,4 \pm 0,8$ mm para os grupos controlo, A e B, respetivamente, sendo que o valor do grupo controlo foi significativamente maior (Fig. 3.4).

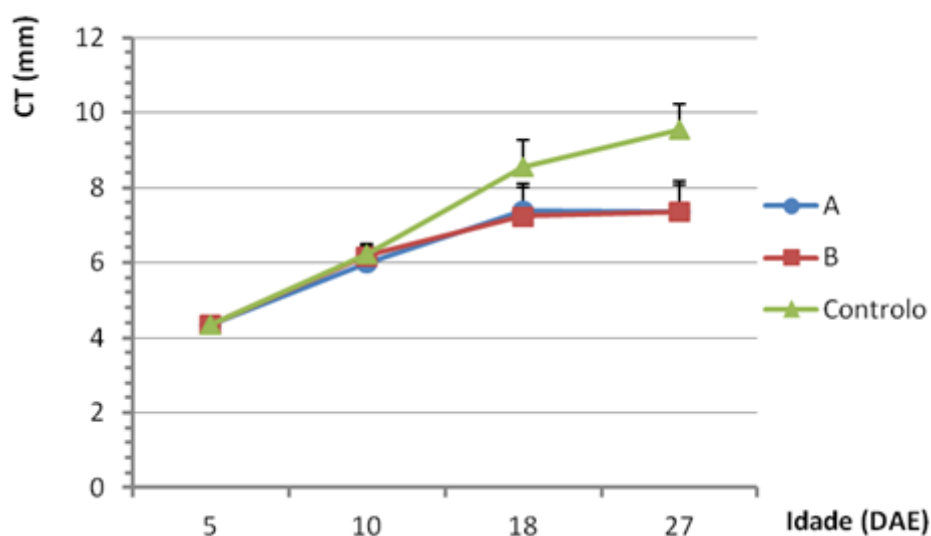


Fig. 3.4- Crescimento comprimento total (CT) em larvas de *Solea senegalensis* para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo).

Relativamente ao peso seco (PS) este foi de $49,5 \pm 7,6 \mu\text{g larva}^{-1}$ a 5 DAE. A 10 DAE, os tratamentos B e controlo exibiram pesos significativamente maiores, sendo o valor do controlo mais elevado com $324,7 \pm 37,6$, seguido do grupo B com $298,6 \pm 34,4$ e, por fim, o grupo A com $252,5 \pm 20,3 \mu\text{g larva}^{-1}$. A 18 DAE o tratamento controlo exibiu um peso seco significativamente maior com $592,7 \pm 59,6 \mu\text{g larva}^{-1}$. No final do ensaio, a 27 DAE, manteve-se a mesma tendência dado que grupo controlo apresentou um peso médio significativamente maior com $1225,7 \pm 420,7 \mu\text{g larva}^{-1}$. Os tratamentos A e B exibiram um peso seco de $379,9 \pm 38,0$ e $389,5 \pm 112,4 \mu\text{g larva}^{-1}$ (Fig. 3.5).

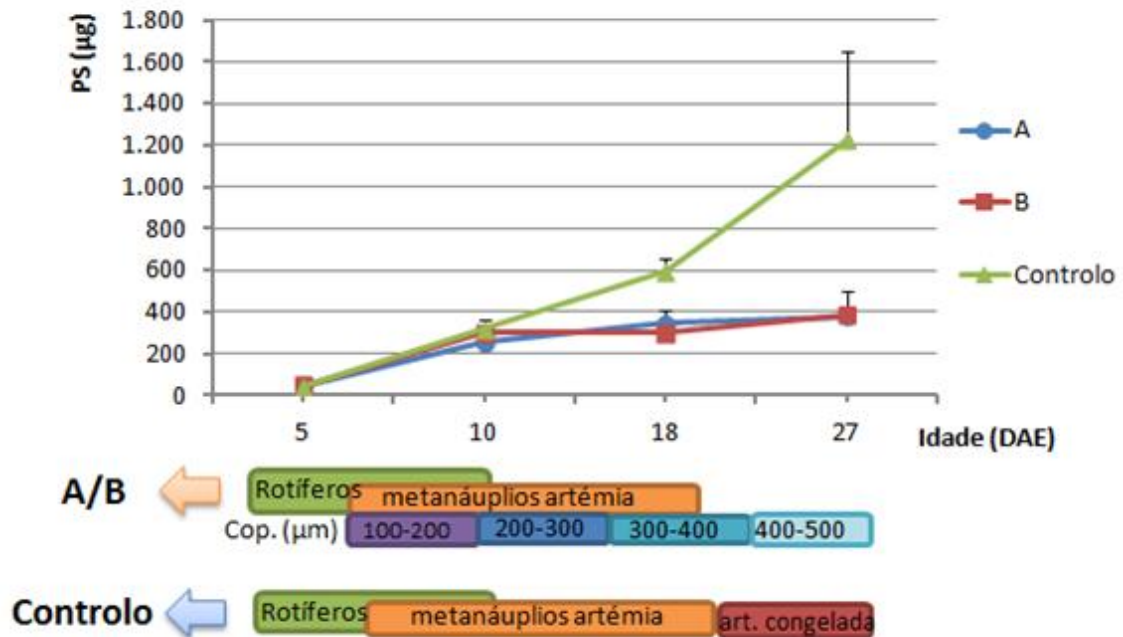


Fig. 3.5 - Crescimento em peso seco (PS) de larvas de *Solea senegalensis* e plano alimentar para os tratamentos A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo).

A sobrevivência das larvas de *S. senegalensis* dos grupos A e controlo sofreu um ligeiro declínio desde o dia 9 até ao dia 27 após a eclosão, quanto à sobrevivência do grupo B, esta diminuiu ligeiramente desde o dia 9 até 23 DAE, sendo que houve um decréscimo um pouco mais acentuado até 27 DAE. Os valores da sobrevivência no final do ensaio foram de $73,0 \pm 9,6$, $61,1 \pm 5,7$ e $76,7 \pm 8,6$ % para os grupos A, B e controlo, respetivamente. Contudo, não se observaram diferenças significativas na sobrevivência entre os três tratamentos (Fig. 3.6).

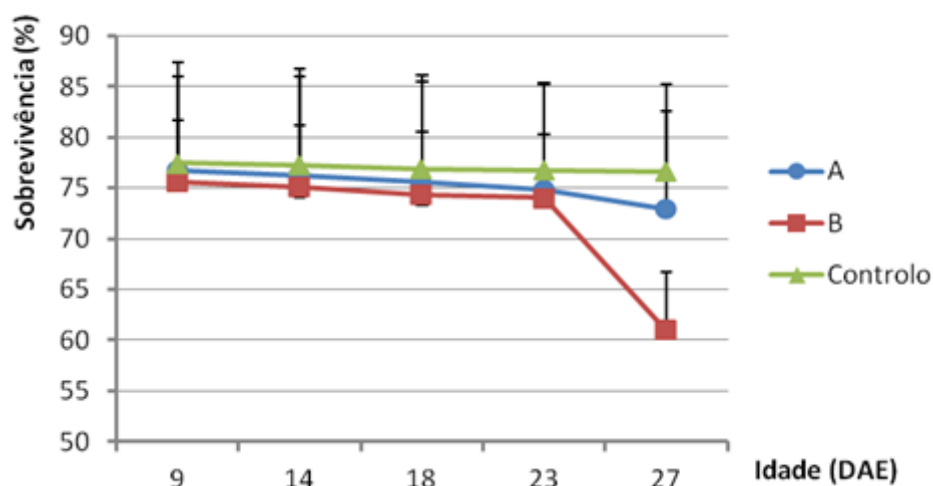


Fig. 3.6 - Sobrevivência larvar de *Solea senegalensis* para os três tratamentos: A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controle (100% alimento vivo).

3.1.2. Crescimento e identificação bacteriana

3.1.2.1. Larvas de dourada

No início do ensaio (antes da introdução de copépodes), os três tratamentos tinham a mesma dieta e, por isso, fez-se um *pool* de A, B e controle e verificou-se que o crescimento bacteriano em geral e de *Vibrionaceae* foi de $6,2 \pm 2,1 \times 10^1$ e $4,9 \pm 1,8$ UFC larva⁻¹, respetivamente. (Fig.13 & 14) No final do ensaio observou-se que o crescimento bacteriano em geral e de *Vibrionaceae* foi significativamente maior no tratamento B com valores de $13,2 \pm 8,1 \times 10^2$ e $12,4 \pm 4,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, respetivamente (Fig.3.7 & 3.8). Relativamente aos tratamentos A e controle, estes apresentaram valores de $2,7 \pm 3,1 \times 10^1$ e $7,5 \pm 5,4 \times 10^1$ para bactérias em geral e valores de $12,3 \pm 9,8$ e $7,0 \pm 6,5 \times 10^1$ para *Vibrionaceae*, respetivamente.

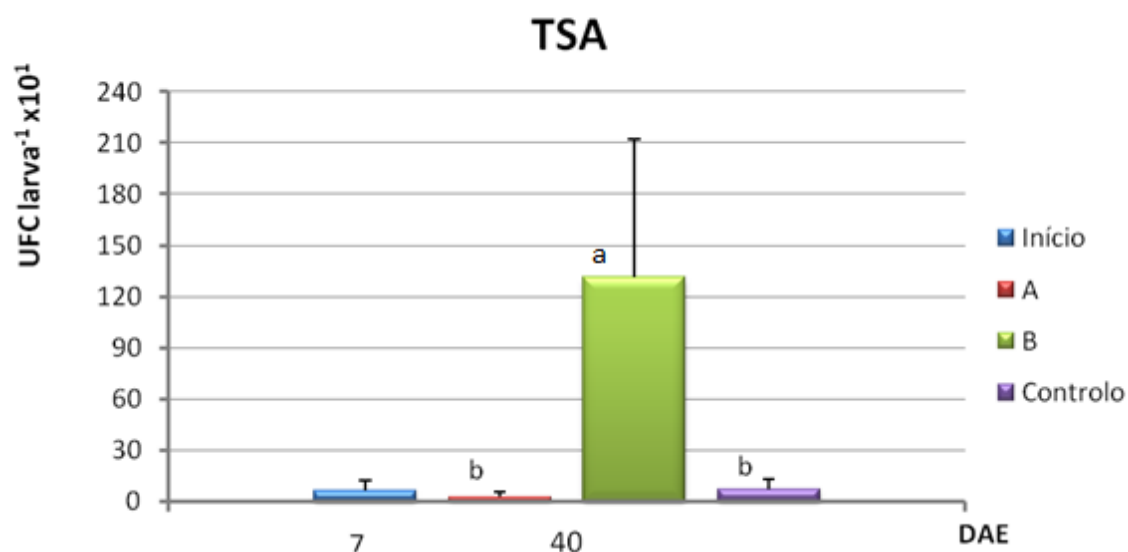


Fig. 3.7 - Número de UFC larva⁻¹ que cresceram em meio TSA no início do ensaio (antes da introdução de copépodes) e no final do ensaio nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Sparus aurata*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a e b.

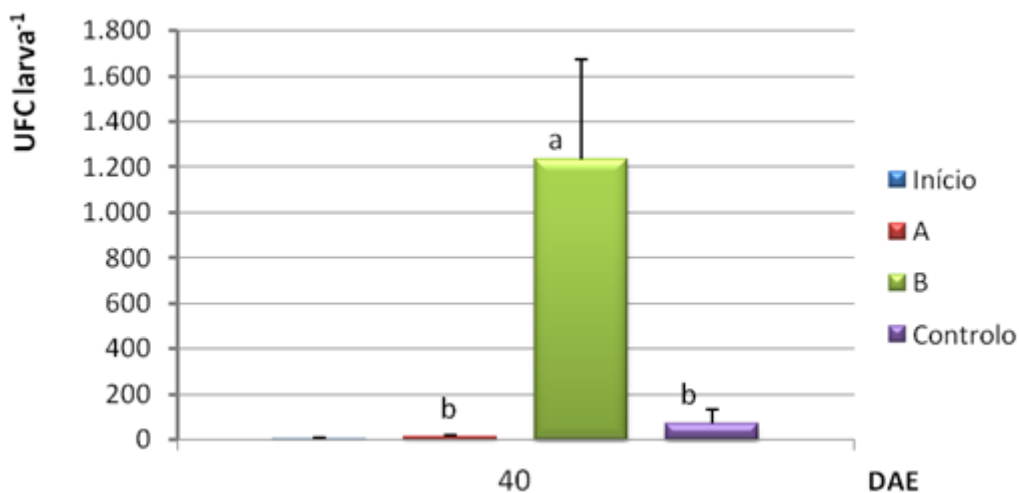


Fig. 3.8 - Número de *Vibrionaceae* (UFC larva⁻¹) que cresceram em meio TBBS no início do ensaio e no final do ensaio nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Sparus aurata*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a e b.

No início do ensaio fez-se um *pool* de A, B e controlo para analisar o crescimento bacteriano. Após a identificação verificou-se que a comunidade bacteriana era composta por 60% de *Vibrio* sp., 20% de *Moellerella* sp. e 20% de *Photobacterium* sp. (Fig. 3.9).

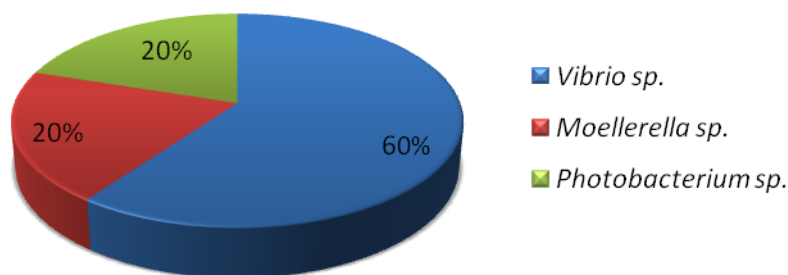


Fig. 3.9 - Percentagem de gêneros de bactérias identificados no início do ensaio em larvas de *Sparus aurata*.

No final do ensaio isolaram-se e identificaram-se as colônias que apresentaram maior significância. Para os tratamentos A e controlo o grupo das bactérias do género *Vibrio* foi o que teve maior incidência, seguido de *Aeromonas sp.*, *Photobacterium sp.*, *Micrococcus sp.* e outros géneros como *Pantoea* e *Listonella* que apareceram na mesma proporção. Quanto ao tratamento B, *Vibrio sp.* e *Aeromonas sp.* tiveram a mesma incidência, seguidos de *Photobacterium sp.* e *Micrococcus sp.* que também incidiram com a mesma proporção e por último outros géneros bacterianos (Fig. 3.10).

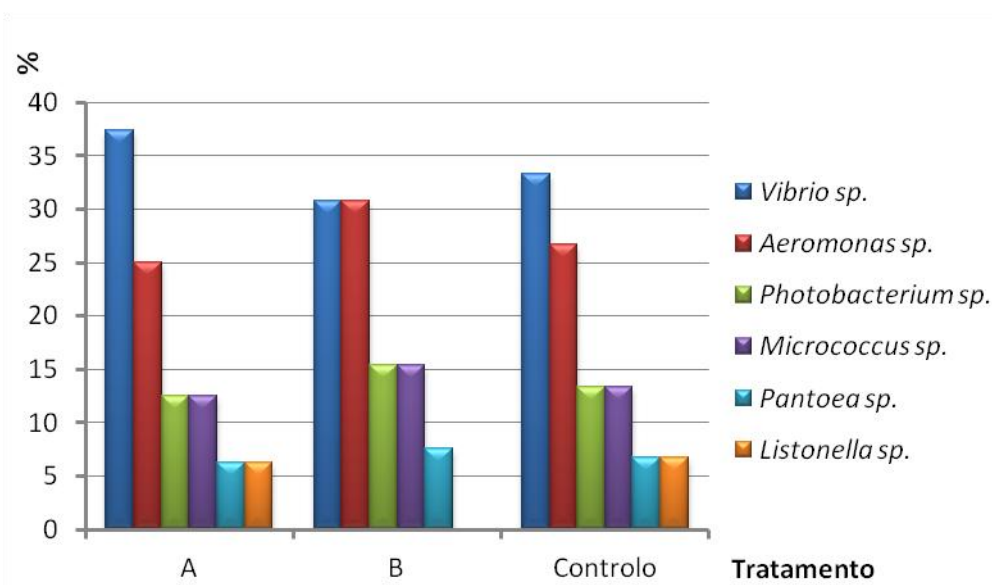


Fig. 3.10 - Percentagem de gêneros de bactérias identificados no final do ensaio para os três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo), em larvas de *Sparus aurata*.

Fez-se o cálculo da percentagem de *Vibrionaceae* isolado em meio TCBS em relação ao número total de bactérias que foi isolado em meio TSA para 7 e 40 DAE. A 7 DAE, antes da introdução dos copépodes, o género *Vibrio* teve a incidência de 8,0% para um *pool* retirado dos três tratamentos. A 40 DAE os grupos B e controlo apresentaram valores mais elevados com 94,0 e 95,6%, respetivamente e, por fim, o grupo A exibiu uma percentagem de *Vibrionaceae* de 46,1% (Tabela 3.I).

Tabela 3.I – Percentagem de *Vibrionaceae* sobre o nº total de bactérias isolado a 7 e 40 DAE para os três tratamentos (A, B e controlo) em larvas de *Sparus aurata*.

| DAE | A | B | Controlo |
|-----|------|------|----------|
| 7 | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| 40 | 46,1 | 94,0 | 93,6 |

3.1.2.2. Larvas de linguado

No início do ensaio, a 5 DAE, (antes da introdução de copépodes), os três tratamentos tinham a mesma dieta e, por isso, fez-se um *pool* de A, B e controlo e verificou-se que o crescimento bacteriano em geral em meio TSA foi de $4,6 \pm 1,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹. A 11 DAE, antes da metamorfose, verificou-se um crescimento bacteriano significativamente maior no grupo A com $9,9 \pm 1,9 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ comparativamente aos grupos B e controlo que apresentaram valores de $1,6 \pm 0,2 \times 10^2$ e $1,4 \pm 0,5 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, respetivamente. Após a metamorfose, a 26 DAE, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que o grupo controlo demonstrou uma maior carga bacteriana com $6,7 \pm 0,6 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, seguido do grupo B com $3,8 \pm 0,66 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ e, por fim, o grupo A com $0,8 \pm 0,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ (Fig. 3.11).

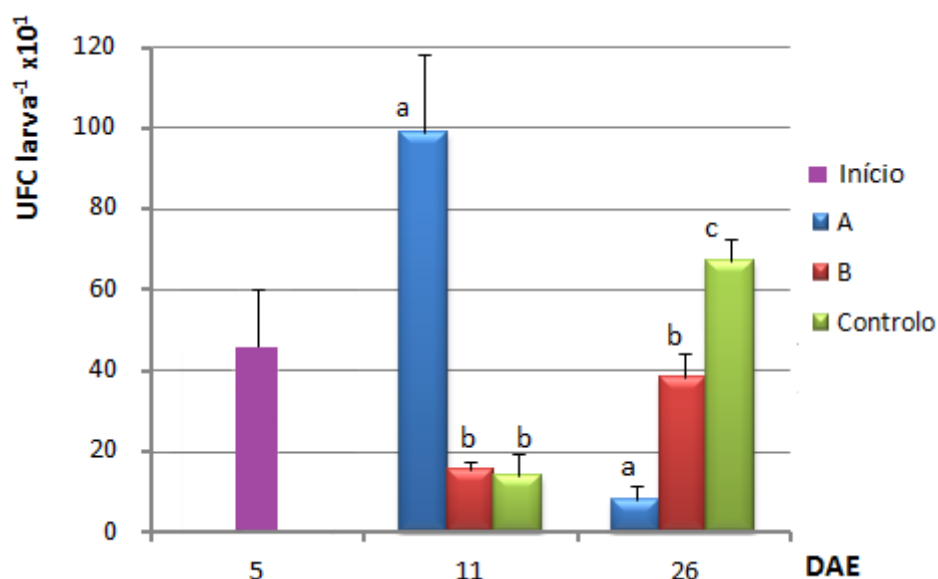


Fig. 3.11- Número de UFC larva⁻¹ x10¹ que cresceram em meio TSA no início do ensaio (5 DAE), antes da metamorfose (11 DAE) e depois da metamorfose e final do ensaio (26DAE) nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodos preservados), B (alimento vivo substituído por copépodos preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Solea senegalensis*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a, b e c.

Analisando o crescimento de *Vibrionaceae*, verificou-se que aos 5 DAE o seu valor foi de $4,7 \pm 0,9$ UFC larva⁻¹. Antes da metamorfose, a 11 DAE, o maior valor foi observado no grupo controlo com $10,9 \pm 4,4$ UFC larva⁻¹, seguido do grupo A e B com $9,5 \pm 5,9$ e $3,4 \pm 3,1$ UFC larva⁻¹, respetivamente. Apenas houve diferenças significativas entre os grupos B e controlo. A 26 DAE o valor mais elevado de *Vibrionaceae* correspondeu ao tratamento controlo com $5,1 \pm 1,3 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, seguido do grupo B com $1,4 \pm 1,6 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, e por fim, o grupo A apresentou o valor significativamente mais baixo com $3,3 \pm 1,0$ UFC larva⁻¹ (Fig. 3.12).

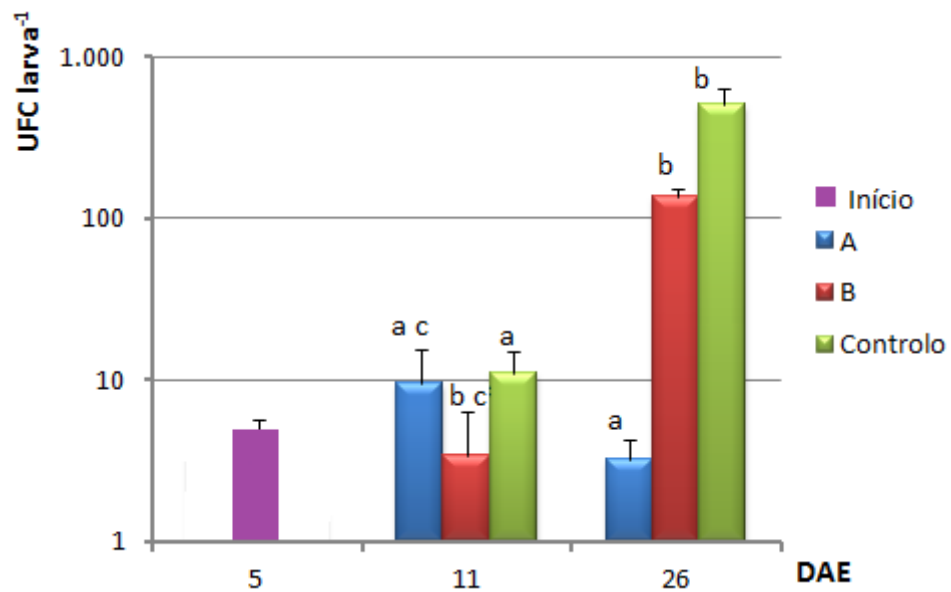


Fig. 3.12- Número de *Vibriaceae* (UFC larva⁻¹) que cresceram em meio TBCS no início do ensaio (5 DAE), antes da metamorfose (11 DAE) e depois da metamorfose e final do ensaio (26 DAE) nos três tratamentos, A (50% alimento vivo e 50% copépodes preservados), B (alimento vivo substituído por copépodes preservados de 20 até 100%) e controlo (100% alimento vivo) em larvas de *Solea senegalensis*. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a, b e c.

No início do ensaio fez-se um *pool* de todos tratamentos (A, B e controlo) a fim de analisar o crescimento bacteriano. Após a identificação verificou-se que a comunidade bacteriana era maioritariamente composta por *Vibrio* sp. (50%), seguido por *Aeromonas* sp. (15%). Também foram isolados outros géneros bacterianos como *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Phenon* 14, *Taxon* 28 e *Staphylococcus* sp. (7%). (Fig. 3.13)

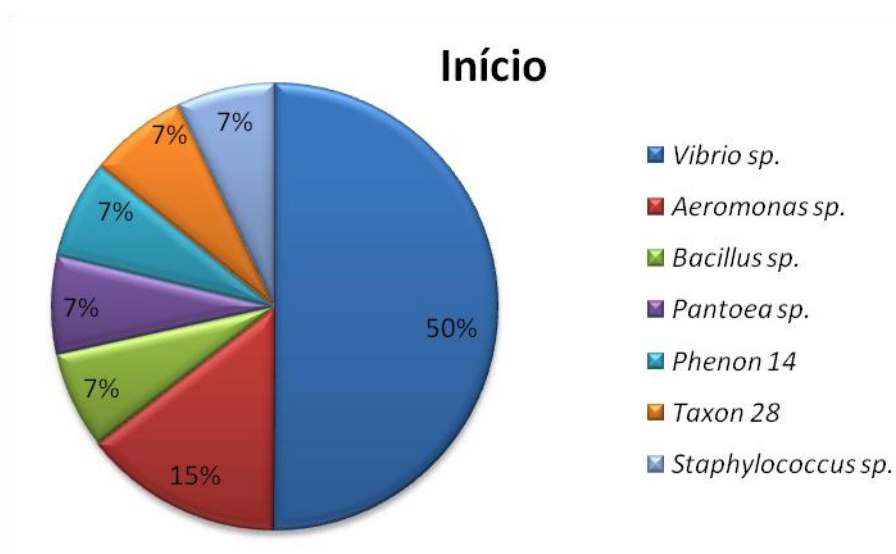


Fig. 3.13- Percentagem de géneros de bactérias identificados no início do ensaio em larvas de *Solea senegalensis*.

A 11 DAE, antes da metamorfose, analisou-se o crescimento bacteriano nos três tratamentos e concluiu-se que o género *Vibrio* sp. apresentou maior incidência em todos os tratamentos com 50 % para os grupos A e controlo e 60% no grupo B. No tratamento A seguiram-se *Aeromonas* sp, *Pantoea* sp. e *Photobacterium* sp., todos os géneros com 16,7% de incidência. Nos restantes grupos seguiram-se *Aeromonas* sp. e *Photobacterium* sp. na mesma proporção com 20 e 25% de incidência para B e controlo, respetivamente (Fig. 3.14).

No final do ensaio, e após a metamorfose, aos 27 DAE voltou-se a analisar o crescimento bacteriano, sendo que o grupo A apresentou 100% de *Vibrio* sp., no grupo B incidiram 87,5% de *Vibrio* sp. e 12,5% de *Aeromonas* sp. e no controlo verificou-se 83,3% de *Vibrio* sp. e 16,7% de *Aeromonas* sp. (Fig. 3.15).

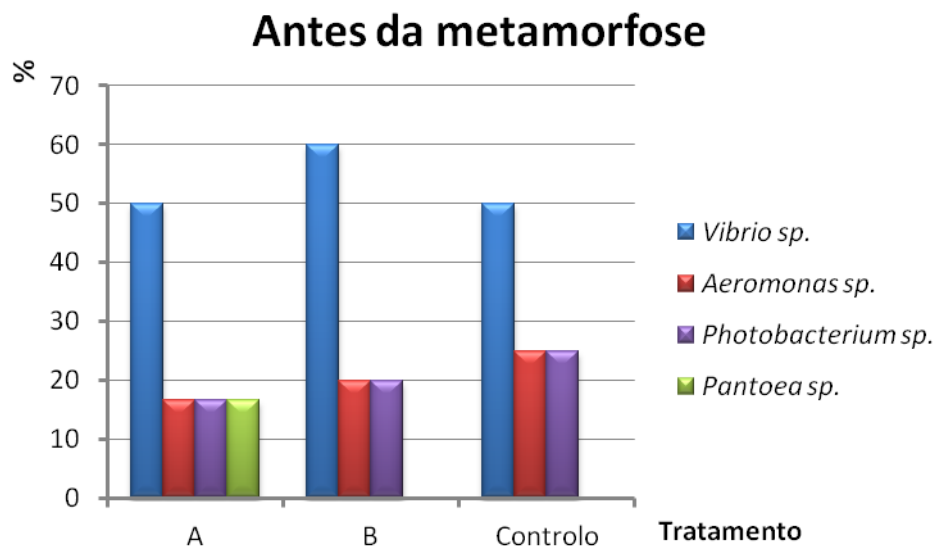


Fig. 3.14 - Percentagem de géneros de bactérias identificados antes da metamorfose (11DAE) das larvas de *Solea senegalensis*.

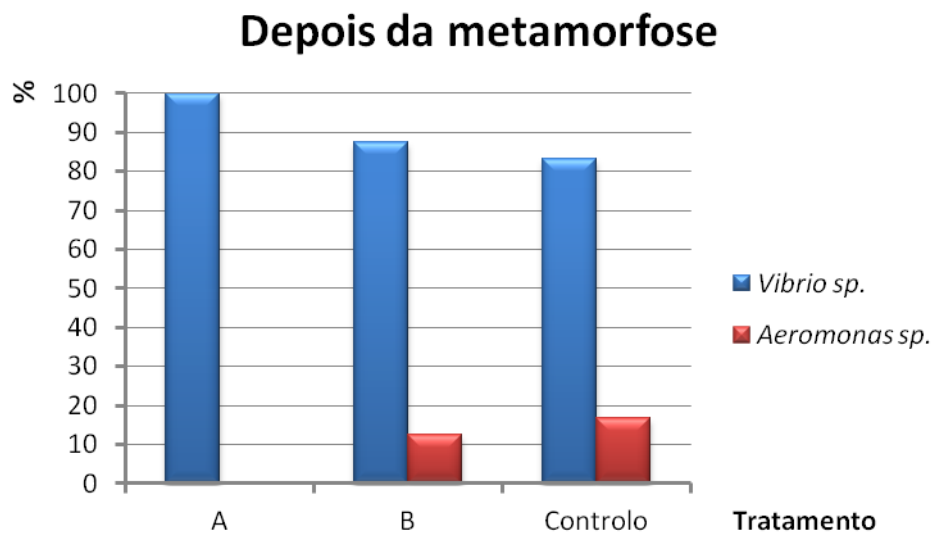


Fig. 3.15 - Percentagem de géneros de bactérias identificados depois da metamorfose (27 DAE) das larvas de *Solea senegalensis*.

Fez-se o cálculo da percentagem de *Vibrionaceae* isolado em meio TCBS em relação ao número total de bactérias que foi isolado em meio TSA para 5, 11 e 26 DAE. A 5 DAE, antes da introdução dos copépodes, o género *Vibrio* teve a incidência de 1,0% para um *pool* retirado dos três tratamentos. A 11 DAE, antes da metamorfose, o grupo controlo apresentou uma percentagem de 7,7%, seguido do grupo B com 2,2% e do grupo A com 1,0%. A 26 DAE, depois da metamorfose, os grupos controlo e B apresentaram valores mais elevados com 76,6 e 35,3%, respetivamente. Finalmente o grupo A exibiu uma percentagem de *Vibrionaceae* de 4,1% (Tabela 3.II).

Tabela 3.II – Percentagem de *Vibrionaceae* sobre o nº total de bactérias isolado a 5, 11 e 26 DAE para os três tratamentos (A, B e controlo) em larvas de *Solea senegalensis*.

| DAE | A | B | Controlo |
|-----|-----|------|----------|
| 5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 11 | 1,0 | 2,2 | 7,7 |
| 26 | 4,1 | 35,3 | 76,6 |

3.2. Ensaio alimentares com copépodes em juvenis de linguado

3.2.1. Crescimento e sobrevivência dos juvenis

No início do ensaio, o comprimento médio dos juvenis de linguado era de $18,4 \pm 3,2$ e $18,4 \pm 3,5$ mm e o peso médio era de $59,4 \pm 26,2$ e $56,6 \pm 26,3$ mg para os tratamentos copépodes e controlo, respetivamente. Após os 60 dias do ensaio, verificou-se que tanto o comprimento como o peso foram significativamente maiores no grupo controlo que atingiu um comprimento médio de $42,9 \pm 9,8$ mm e um peso médio de $960,1 \pm 597,1$ mg (Fig. 3.16 & 3.17).

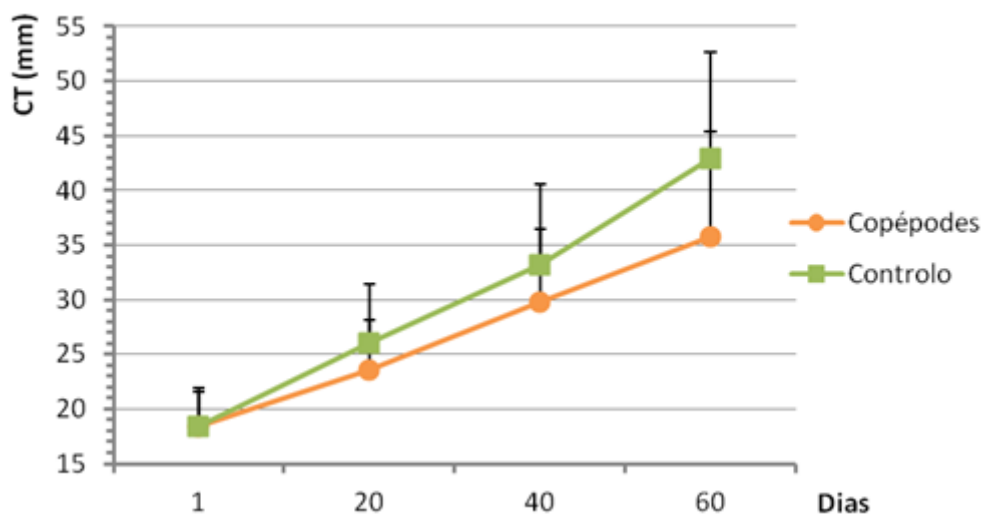


Fig. 3.16 - Crescimento em comprimento (CT) de juvenis de *Solea senegalensis* para os tratamentos de copépodes e controlo.

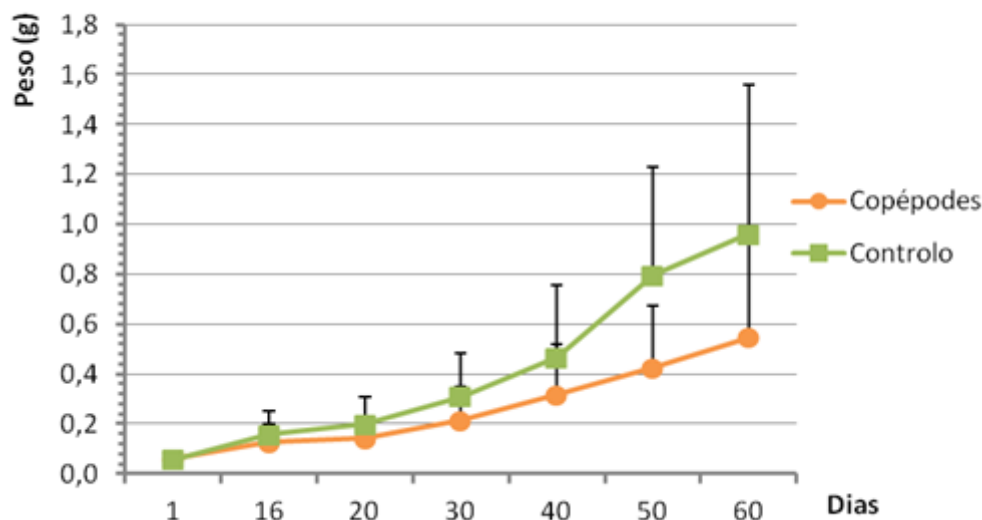


Fig. 3.17 - Crescimento em peso húmido de juvenis de *Solea senegalensis* para os tratamentos de copépodes e controlo.

No que diz respeito ao peso seco, no início do ensaio não havia diferenças significativas entre os dois grupos sendo que os valores médios eram de $13,7 \pm 6,1$ e $9,3 \pm 5,6$ mg para os tratamentos com copépodes e controlo, respetivamente. No final do ensaio, após 60 dias, verificou-se que o peso seco do grupo controlo foi significativamente maior com um valor de $370,0 \pm 45,2$ mg (Tabela 3.III).

Tabela 3.III – Peso seco inicial e final do ensaio para os tratamentos com copépodes e controlo.

| Tratamento | Peso seco inicial (mg) | Peso seco final (mg) |
|------------------|------------------------|----------------------|
| Copépodes | $13,7 \pm 6,1$ | $123,3 \pm 68,7$ |
| Controlo | $9,3 \pm 5,6$ | $370,0 \pm 45,2$ |

Relativamente à sobrevivência, verificou-se um decréscimo em ambos os grupos desde o início até ao final do ensaio, após 60 dias, em que os valores foram de $51,3 \pm 17,5$ e $75,5 \pm 6,2$ % para o tratamento com copépodes e controlo, respetivamente. Contudo, não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos durante o ensaio (Fig. 3.18).

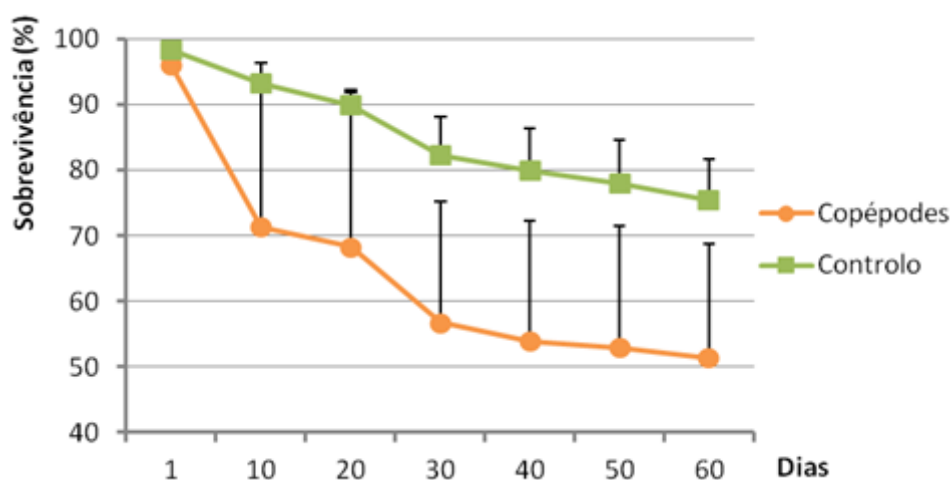


Fig. 3.18 - Sobrevivência de juvenis de *Solea senegalensis* para os tratamentos copépodes e controlo.

3.2.2. Crescimento e identificação bacteriana

No final do ensaio observou-se que o crescimento da flora bacteriana intestinal em meio TSA foi significativamente maior no tratamento com copépodes com um valor de $38,5 \pm 22,8 \times 10^2$ UFC cm^{-1} , quanto ao tratamento controlo o crescimento bacteriano atingiu o valor de $13,3 \pm 1,0 \times 10^2$ UFC cm^{-1} (Fig. 3.19). Relativamente ao crescimento de *Vibrionaceae* no intestino não se verificaram diferenças significativas, sendo que os valores foram de $4,6 \pm 3,6 \times 10^2$ e $3,3 \pm 2,2 \times 10^2$ UFC cm^{-1} para o tratamento com copépodes e controlo, respetivamente (Fig. 3.20).

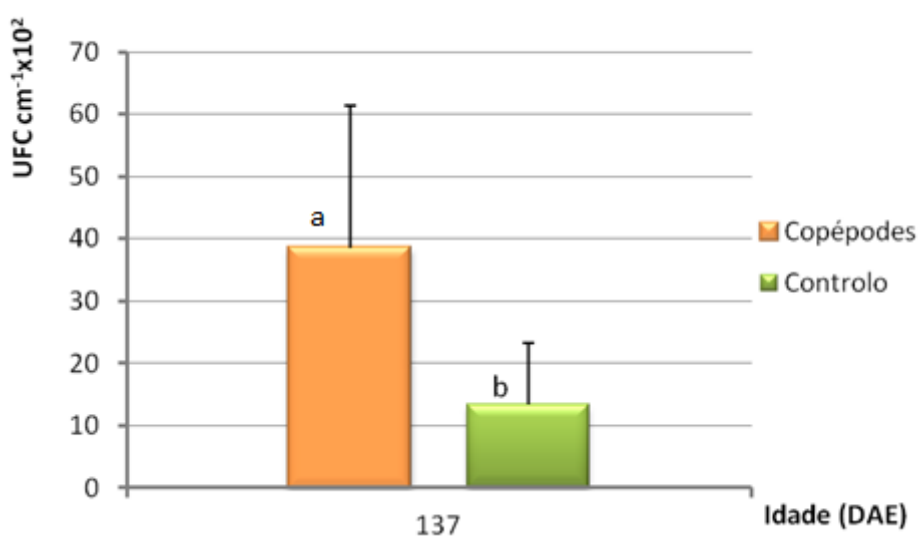


Fig. 3.19 - Número de UFC cm^{-1} que cresceram em meio TSA provenientes do intestino de *Solea senegalensis* para os tratamentos copépodes e controlo. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para letras diferentes, a e b.

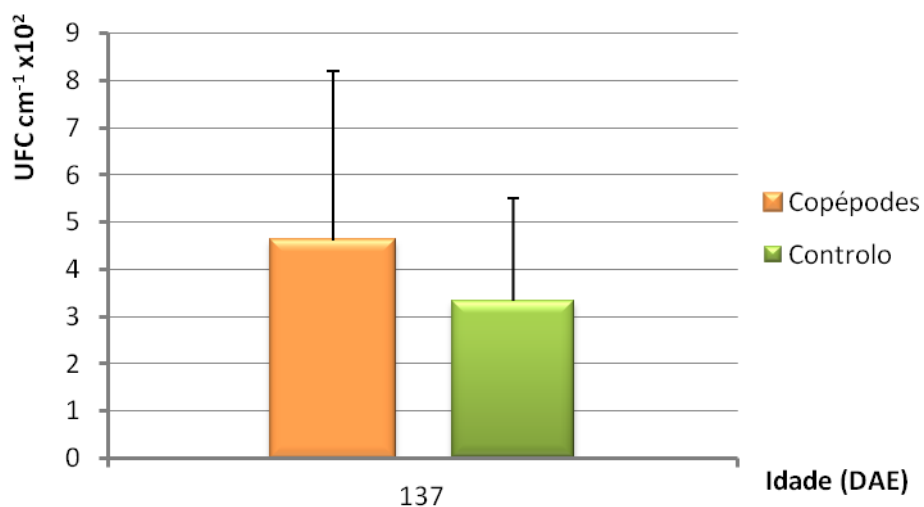


Fig. 3.20 - Número de *Vibriaceae* (UFC cm⁻¹ x 10²) que cresceram em meio TCBS, provenientes do intestino de *Solea senegalensis* para os tratamentos copépodes e controlo.

No que diz respeito ao pH, este foi medido nos intestinos dos juvenis de ambos os tratamentos, verificando-se que não existiam diferenças significativas entre os dois grupos. Os valores de pH foram de $5,6 \pm 0,3$ e $5,4 \pm 0,1$ para o tratamento com copépodes e controlo, respetivamente (Fig. 3.21).

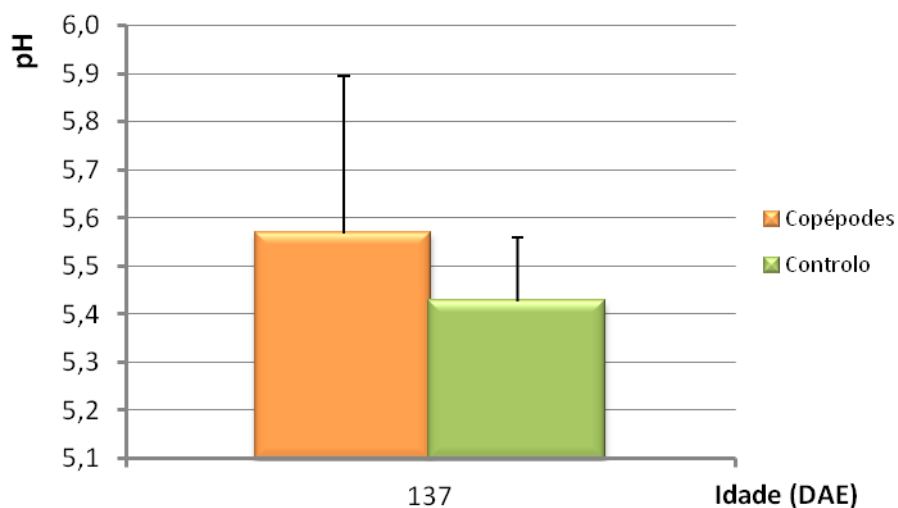


Fig. 3.21 - Valores de pH no intestino nos tratamentos copépodes e controlo em *Solea senegalensis*.

No início do ensaio fez-se um *pool* de ambos os tratamentos a fim de analisar o crescimento bacteriano. Após a identificação verificou-se que a comunidade bacteriana

era maioritariamente composta por *Vibrio* sp. e *Aeromonas* sp. (44%), seguida de *Photobacterium* sp. (11%) (Fig. 3.22).

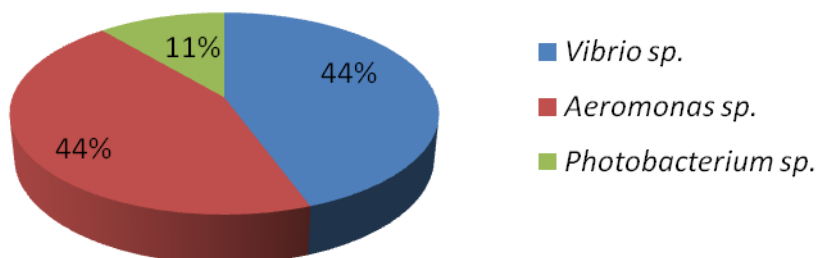


Fig. 3.22 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no início do ensaio em juvenis de *Solea senegalensis*.

No final do ensaio isolaram-se e identificaram-se as colónias que apresentaram maior significância. Para os tratamentos com copépodes e controlo o grupo *Vibrio* sp. foi o que teve maior incidência, seguido de *Aeromonas* sp. Outros grupos com menor incidência também foram isolados em ambos os tratamentos como *Photobacterium* sp., *Brevibacillus* sp., *Phenon 5*. Apenas no tratamento com copépodes se isolou o grupo *Micrococcus* sp. (Fig. 3.23 & 3.24).

Copépodes

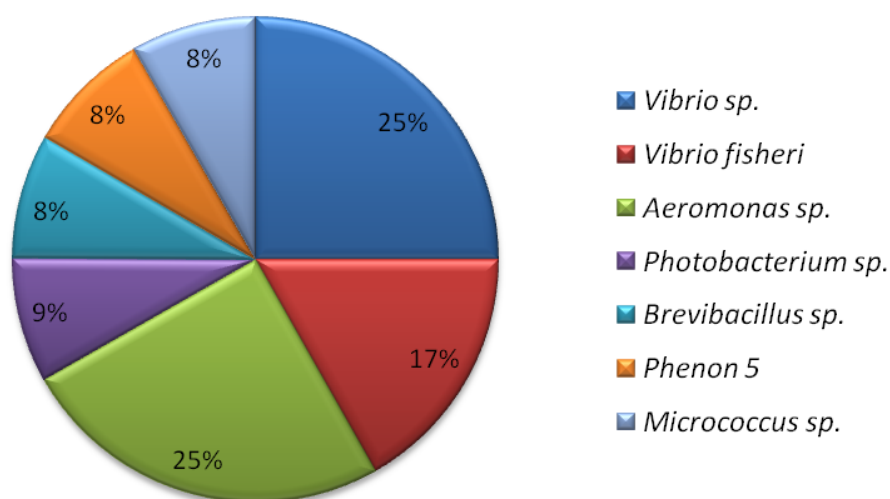


Fig. 3.23 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no final do ensaio para o tratamento com copépodes em juvenis de *Solea senegalensis*.

Controlo

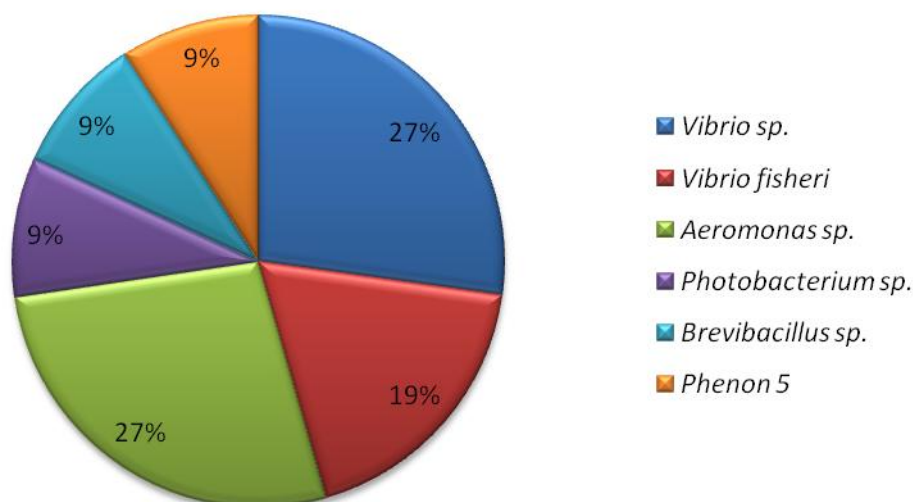


Fig. 3.24 - Percentagem de géneros de bactérias identificados no final do ensaio para o controlo em juvenis de *Solea senegalensis*.

Após a análise do crescimento das comunidades bacterianas no início e no fim do ensaio fez-se uma relação entre as percentagens de *Vibrionaceae* que cresceram em meio TCBS sobre o número total de bactérias presentes em TSA. Assim, encontrou-se 10,2% de *Vibrio sp.* no início do ensaio, 12,0% no tratamento com copépodes e 25,0% no controlo (Tabela 3.IV).

Tabela 3.IV - Percentagem de *Vibrionaceae* no início e no final do ensaio para os tratamentos com copépodes e controlo em juvenis de *Solea senegalensis*.

| Tratamento | Copépodes | Controlo |
|------------|-----------|----------|
| Início | 10,2% | 10,2% |
| Final | 12,0% | 25,0% |

4. Discussão

No ensaio de alimentação em larvas de dourada, os grupos A e controlo obtiveram melhores resultados em termos de crescimento, não havendo diferenças significativas entre os dois grupos. O grupo controlo apresentou um valor ligeiramente mais elevado para o peso seco com $3596,8 \pm 534,0 \mu\text{g larva}^{-1}$ e o grupo A apresentou um valor mais elevado para o comprimento com $15,2 \pm 1,3 \text{ mm}$, ambos para larvas de 42 DAE. A média de comprimentos totais dos grupos A e controlo está de acordo com os resultados descritos por [Moretti et al., \(1999\)](#) para larvas de dourada com 45 DAE. No entanto, os valores médios de peso seco das larvas de 42 DAE apresentaram-se superiores em comparação ao que foi observado por [Aragão et al., \(2004\)](#) para larvas de dourada de 45 DAE. Estes resultados podem ser justificados com o fato de ter sido aplicada uma estratégia de co-alimentação. Nesta estratégia aliou-se o perfil nutricional mais adequado dos copépodes à disponibilidade do alimento vivo, ou seja, com os copépodes garantiu-se o fornecimento de ácidos gordos essenciais e com o alimento vivo garantiu-se que havia sempre presas disponíveis na coluna de água, nunca privando as larvas de se alimentarem. Desta forma potenciou-se o crescimento larvar e colmataram-se as desvantagens individuais de cada um destes alimentos, isto é, os copépodes apresentam a lacuna de afundarem na coluna de água, tornando-se indisponíveis para ser consumidos pelas larvas de dourada e o alimento vivo (rotíferos e artémia) é mais pobre nutricionalmente, não preenchendo os requerimentos nutricionais das larvas. Assim, com a estratégia da co-alimentação as falhas de cada um dos alimentos foram preenchidas mutuamente, criando uma dieta vantajosa. [Olivotto et al., \(2010\)](#) também testou a eficiência de copépodes preservados na alimentação de larvas de peixe-palhaço, *Amphirion clarkii*, chegando também à conclusão que a co-alimentação com alimento vivo produziu melhores resultados em termos de crescimento e sobrevivência e que o fato dos copépodes afundarem na coluna de água pode constituir um problema para espécies em que a fase larvar é pelágica.

Por outro lado, o grupo B apresentou piores resultados no que diz respeito ao crescimento, o que pode ter que ver com o fato do alimento vivo ter sido progressivamente substituído, até 100%, por copépodes preservados, uma dieta inerte que poderia não apresentar estímulo visual suficiente para ser ingerida pelas larvas antes que estes se afundassem na coluna de água. Deste modo, as larvas do grupo B tinham menos alimento disponível em relação aos outros tratamentos que eram alimentados com presas vivas. [Engrola, \(2008\)](#) demonstrou em larvas de linguado que a digestibilidade e a

retenção proteica são afetadas quando, na estratégia de co-alimentação, são substituídas grandes quantidades de artémia por ração inerte, levando a um crescimento lento.

Existe uma panóplia de fatores que influenciam as larvas na seleção das presas incluindo o tamanho, a densidade e a mobilidade destas (O'Brien, 1979); as características das larvas como a capacidade sensorial e motora, experiência prévia, dimensões da boca e comprimento do corpo (Cox & Pankhurst, 2000); e fatores ambientais como a intensidade e espectro luminoso, turbidez da água e temperatura (Cobcroft *et al.*, 2001). Na literatura, o que se considera determinante na seleção de presas concentra-se muito na relação entre tamanho da presa-tamanho da boca da larva mas outros fatores como a cor, o cheiro e o movimento são igualmente importantes. É necessário um melhor conhecimento destes fatores de modo a gerir a alimentação numa larvicultura em regime intensivo (Planas & Cunha, 1999).

Em aquacultura, as condições de cultivo em cativeiro podem ser fontes de *stress*, despoletando uma elevada mortalidade, especialmente no cultivo larvar (Avella *et al.*, 2010), o que pode justificar a grande taxa de mortalidade inicial até 14 DAE observada nas larvas de *S. aurata*. Apesar dos diferentes tratamentos, não se verificou diferença significativa na sobrevivência dos três grupos, sendo que o tratamento A apresentou um valor um pouco maior para 42 DAE de $5,0 \pm 4,5$ %. Este valor de sobrevivência é inferior ao reportado por Suzer *et al.*, (2008) para larvas de dourada de 35 DAE.

Relativamente à flora microbiana do trato digestivo das larvas de dourada no início do ensaio, antes da introdução dos copépodes na dieta, esta teve os valores de $61,5 \pm 20,9$ UFC larva⁻¹ para bactérias no geral e de $4,9 \pm 1,8$ UFC larva⁻¹ para *Vibrionaceae*, em que o primeiro valor se apresenta inferior comparando com os resultados obtidos por Avella *et al.*, (2010) para larvas desta espécie com 7 DAE. O grupo B apresentou uma carga bacteriana significativamente maior que os outros grupos com valores de $13,2 \pm 8,0 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para bactérias no geral e de $12,4 \pm 4,4 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para *Vibrionaceae*, mais uma vez o valor de *Vibrionaceae* está de acordo com os resultados observados por Avella *et al.*, (2010) e o valor de bactérias em geral apresentou-se um pouco mais baixo para larvas de 40 DAE. Os grupos A e controlo apresentaram uma carga bacteriana muito menor do que a encontrada na literatura (Avella *et al.*, 2010; Austin, 2006) A presença de uma maior carga bacteriana no grupo B pode ser explicada devido ao uso de copépodes preservados, uma vez que estes se conservavam numa embalagem que, depois de aberta, ainda demorou alguns dias para que chegasse ao fim,

o fato de passarem por diversas operações de manejo antes de serem fornecidos bem como as próprias características do produto podem ter potenciado o desenvolvimento bacteriano, levado a uma maior contaminação.

No que diz respeito à composição da microbiota das larvas de *S. aurata*, esta foi analisada antes da introdução dos copépodes (7 DAE) e no final no ensaio (40 DAE). A 7 DAE foram isolados os gêneros *Vibrio*, *Moellerella* e *Photobacterium* e a 40 DAE foram isolados dos três tratamentos os gêneros *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Photobacterium* sp., *Micrococcus* sp. e *Pantoea* sp., exceto o gênero *Listonella* que não foi isolado no grupo B. A predominância dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* está de acordo com [Savas et al., \(2005\)](#) para larvas de dourada com 45 DAE.

No ensaio de alimentação em larvas de linguado o grupo controle obteve os melhores resultados em termos de crescimento, apresentando um comprimento e peso seco médios significativamente maiores a partir de 18 DAE, terminando com $9,6 \pm 0,7$ mm e $1225,7 \pm 420,7$ $\mu\text{g larva}^{-1}$ a 27 DAE, valores que estão de acordo com os reportados por [Bonaldo et al., \(2011\)](#) para larvas de *Solea solea* de 25 DAE. [Engrola et al., \(2009\)](#) demonstrou que, em larvas de linguado, quando é feita uma substituição moderada de artêmia, há uma adaptação do metabolismo do linguado de modo a promover a utilização da proteína a longo prazo, potenciando o crescimento. O fato de os grupos A e B terem terminado com uma dieta composta apenas por copépodes pode ter influenciado negativamente o seu crescimento, aliando ao fato da fraca aceitação dos copépodes pelas larvas de *S. senegalensis*.

A sobrevivência das larvas de *Solea senegalensis* não demonstrou diferença significativa entre tratamentos, embora o grupo controle tenha apresentado um valor ligeiramente maior com $76,7 \pm 8,6$ % no final do ensaio, a 27 DAE, valor que se encontra de acordo com o valor reportado por [Fernández-Díaz et al., \(2001\)](#) para larvas de linguado de 25 DAE.

No que diz respeito ao crescimento bacteriano nas larvas de linguado, antes da introdução dos copépodes (5 DAE) observaram-se valores de $4,5 \pm 1,4 \times 10^2$ para bactérias em geral e $4,8 \pm 0,9$ UFC larva⁻¹ para *Vibrionaceae*, valores que estão de acordo com os reportados por [Vine et al., \(2006\)](#) para larvas de rodovalho até 4 DAE. No ponto de amostragem seguinte, antes de ocorrer a metamorfose (11 DAE), o grupo A demonstrou um valor significativamente maior para bactérias em geral com $9,9 \pm 1,9 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ enquanto para *Vibrionaceae* o grupo controle apresentou um crescimento significativamente maior com $10,9 \pm 4,4$ UFC larva⁻¹ em relação ao grupo B. A 26 DAE o

grupo controlo manteve uma carga bacteriana significativamente maior com $6,7 \pm 0,6 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para bactérias em geral e $5,1 \pm 1,39 \times 10^2$ UFC larva⁻¹ para *Vibrionaceae*. Estes valores apresentam-se menores que os reportados por [Nicolas et al., \(1989\)](#) para larvas de rodovalho (*Scophthalmus maximus*). Sendo que os principais veículos de transmissão de microrganismos são o alimento e a água circundante, esta carga bacteriana mais elevada do grupo controlo pode ter que ver com o fato deste tratamento ter ingerido mais alimento que os grupos A e B, uma vez que os copépodes não foram muito bem aceites por parte das larvas, havendo dias em que não se observou a sua ingestão. [Hansen & Olafsen \(1999\)](#) também descreveram diferenças na microbiota intestinal em termos de quantidade dependendo do estado de nutrição das larvas uma vez que as bactérias ingeridas no alimento dominam quantitativamente a microbiota presente no trato digestivo.

Relativamente à composição da microbiota das larvas de *S. senegalensis*, aos 5 DAE foram isolados vários géneros bacterianos, sendo que os dominantes foram *Vibrio* e *Aeromonas*. Aos 11 DAE, antes da metamorfose, manteve-se a dominância de *Vibrio* e *Aeromonas* nos três tratamentos e a única diferença encontrada consistiu no género *Pantoea* que apenas foi isolado do grupo A. Aos 26 DAE, após a metamorfose, foram isolados os géneros *Vibrio* e *Aeromonas* nos tratamentos B e controlo enquanto no grupo A o único género isolado foi *Vibrio*. O fato de na última amostragem apenas se terem identificado dois géneros bacterianos pode ser explicado pelo fato de apenas se terem recolhido 10 larvas por tratamento devido à indisponibilidade de indivíduos e também por se terem perdido bactérias no processo de identificação. Contudo, foi reportado por [Bergh et al., \(1994\)](#) que, em larvas de halibute (*Hippoglossus hippoglossus*), a microflora do trato digestivo torna-se gradualmente dominada pelos géneros *Vibrio* e *Aeromonas* após o início da alimentação exógena.

Nas larvas de dourada e de linguado e independentemente dos tratamentos (A, B e controlo), os géneros bacterianos que apresentaram maior incidência na microflora das larvas foram *Vibrio* e *Aeromonas*. A primeira colonização do trato intestinal das larvas pode ocorrer ainda na fase do saco vitelino quando estas ingerem água ou então é estabelecida com a primeira alimentação exógena, isto é, a colonização é feita pelas bactérias presentes no alimento e na água ([Hansen & Olafsen, 1999](#)). [Munro et al., \(1994\)](#) indicam que, nas larvas de rodovalho, a colonização do trato digestivo coincide com o início da alimentação, sendo a microflora dominada pelos géneros *Aeromonas* e *Vibrio*. Em dourada e robalo observou-se uma maior incidência de *V. anguillarum*, *V. tubiashii* e de outros grupos quando as larvas foram alimentadas com rotíferos, por outro

lado, quando foram alimentadas com artémia houve maior ocorrência de *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi*, e *V. natriegens*, sendo que os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Erwinia* também foram isolados (Austin, 2006; Igarashi *et al.*, 1989). Deste modo, a alteração do grupo de bactérias dominante na microflora está diretamente ligada com a alimentação, isto é, a microflora intestinal varia de acordo com a carga bacteriana presente no alimento (Austin, 2006).

No ensaio de alimentação com copépodes nos juvenis de linguado observou-se que no final do período experimental, após 60 dias (135 DAE), tanto o comprimento como o peso foram significativamente maiores no grupo controle que atingiu um comprimento médio de $42,9 \pm 9,8$ mm, um peso húmido médio de $960,1 \pm 597,1$ mg e um peso seco médio de $370 \pm 45,2$ mg. Os valores de comprimento estão um pouco acima do que foi reportado por Lobo *et al.*, (2013) enquanto o peso seco apresenta um valor menor que o reportado pelos mesmos autores para juvenis de *S. senegalensis* com 121 DAE. A diferença significativa entre os tratamentos pode ser explicada pelo fato da dieta com copépodes aparentar uma aceitação menor, uma vez que se observou que os juvenis deixavam mais ração no tanque, havendo assim uma redução no alimento ingerido e, conseqüentemente, no crescimento.

No que diz respeito à sobrevivência dos juvenis de *S. senegalensis*, não se verificou diferença significativa entre os dois tratamentos, apesar do grupo controle apresentar valores mais elevados durante todo o ensaio. Os valores de sobrevivência, após 60 dias de ensaio, foram de $75,5 \pm 6,2$ e de $51,3 \pm 17,5$ % para os tratamentos controle e copépodes, respetivamente. O fato da sobrevivência ter sido inferior no tratamento com copépodes pode estar relacionado com a presença de uma carga bacteriana mais elevado no trato digestivo. Contudo, os valores de sobrevivência de ambos os tratamentos estão de acordo com os reportados por Lobo *et al.*, (2013) para juvenis de *S. senegalensis*.

Nos juvenis de linguado com 135 DAE o tratamento com copépodes apresentou um crescimento da microbiota intestinal significativamente maior que o grupo controle para bactérias em geral com um valor de $38,5 \pm 22,8 \times 10^2$ UFC cm⁻¹, sendo este valor é menor que o reportado por Makridis *et al.*, (2005) para juvenis de linguado. Relativamente ao grupo *Vibrionaceae* fez-se uma comparação dos valores percentuais do seu crescimento no intestino no início (antes da introdução da dieta com copépodes) e no final do ensaio sendo que inicialmente tiveram uma incidência de 44,4%, no tratamento com copépodes apresentaram 41,8% e no controle isolou-se 45,5% de *Vibrio* sp.

Contudo, não se observou diferença no grupo *Vibrionaceae* entre os dois tratamentos no final do ensaio. O fato dos juvenis alimentados com copépodes apresentarem um valor maior para bactérias em geral pode ter que ver com a adição destes microcústáceos na ração, elevando assim a carga bacteriana fornecida através desta dieta.

A composição da microbiota intestinal foi analisada no início e no final do ensaio, sendo que inicialmente foram isolados os géneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Photobacterium* e, após 60 dias de ensaio, os géneros dominantes em ambos os tratamentos foram *Vibrio* e *Aeromonas*, sendo a única diferença caracterizada pelo género *Micrococcus* que apenas foi isolado do tratamento com copépodes. As bactérias isoladas estão de acordo com o reportado por MacDonald *et al.*, (1986) para juvenis de *Solea solea*. Quanto ao pH intestinal não se detetou uma diferença significativa entre os dois tratamentos, embora o grupo controlo tenha apresentado um pH ligeiramente mais baixo com $5,4 \pm 0,1$, o que não está em concordância com Yúfera *et al.*, (2007) que constatou em *S. senegalensis* que o pH se torna mais baixo com o aumento de peso e o seu valor nunca foi inferior a 6,0, independentemente da idade. No entanto, Chakrabarti *et al.*, (1995) verificou que, em espécies com hábitos alimentares omnívoros, os valores de pH do intestino variam entre 5,5 e 7. O fato da ração fornecida aos juvenis de linguado, de ambos os tratamentos, não ser uma dieta especializada para a espécie poderá ter influenciado nos valores de pH.

Com o ensaio larvar de alimentação em *Sparus aurata* chegou-se à conclusão que a utilização de copépodes conservados na dieta só produz um efeito positivo no crescimento quando são administrados juntamente com o alimento vivo *standard* numa estratégia de co-alimentação, uma vez que os melhores resultados foram obtidos no grupo A (50% copépodes preservados e 50% alimento vivo) e controlo (apenas alimento vivo). No ensaio larvar de alimentação em *Solea senegalensis* o melhor resultado em termos de crescimento pertenceu ao grupo controlo em que apenas se utilizaram presas vivas e mais tarde artémia congelada, o fato do grupo controlo apresentar valores mais elevados indica que tem de haver uma otimização da estratégia de co-alimentação, quer seja por ajustamento da quantidade de alimento vivo substituída ou por melhoramento do produto de copépodes de modo a melhorar a sua aceitação pelas larvas de linguado.

No ensaio de alimentação nos juvenis de *S. senegalensis* provou-se que a utilização da ração com 10% de copépodes não trouxe benefícios para o crescimento e para a microbiota intestinal na medida em que se verificou uma maior carga bacteriana nos juvenis alimentados com esta ração. Relativamente à composição da microbiota não se verificou diferença exceto na presença do género *Micrococcus* nos juvenis

alimentados com a ração com copépodes. Na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma dieta suplementada com *Micrococcus luteus* tem um efeito positivo na sobrevivência, no crescimento e na conversão alimentar. Esta bactéria é considerada um probiótico na medida em que melhora o equilíbrio da microflora intestinal, reduzindo as espécies patogênicas que aceleram a absorção de alimento (Gómez & Balcázar, 2008). Neste caso não se observou este efeito benéfico talvez por este não se aplicar ao linguado (*S. senegalensis*) ou então o género de *Micrococcus* que foi isolado não funcionar como probionte.

As bactérias presentes no alimento vivo desempenham um papel importante no desenvolvimento da microflora de larvas de peixes marinhos e uma quebra da qualidade microbiana pode ser responsável por grandes mortalidades na fase larvar (Nicolas *et al.*, 1989). Assim, as propriedades quantitativas e qualitativas da microflora do alimento vivo devem ser ajustadas de modo a evitar efeitos negativos nas larvas como a transmissão de uma carga bacteriana excessiva e, ao mesmo tempo, garantir o sucesso da colonização do trato intestinal (Nicolas *et al.*, 1989). Uma forma de influenciar a microbiota intestinal é através da administração de bactérias benéficas (probióticos). O uso de probióticos caracteriza-se por trazer benefícios à saúde dos peixes, quer na fase larvar, quer na fase adulta, estimulando o desenvolvimento do sistema imunitário do trato digestivo na medida em que as espécies probiontes protegem o seu hospedeiro produzindo metabolitos que inibem a colonização ou o crescimento de outros microrganismos ou por competirem por nutrientes ou locais de adesão com as espécies patogênicas, promovendo a (Burr *et al.*, 2005). Os microrganismos mais utilizados como probióticos consistem em estirpes de *Bacillus*, *Carnobacterium* e *Lactobacillus*, contudo também tem sido explorado o uso de outros géneros como *Aeromonas* e *Vibrio* (Gómez & Balcázar, 2008). No entanto são ainda necessários mais estudos acerca da identificação bacteriana, adaptações ecológicas, benefícios e potencial patogénico da microbiota do trato digestivo que vive associada aos peixes (Avella *et al.*, 2010).

A microbiota do trato digestivo dos peixes é crucial para a saúde e resistência a doenças. Sendo a água e o alimento os principais vetores de transmissão das bactérias que colonizam o sistema digestivo, torna-se necessário ajustar as propriedades quantitativas e qualitativas da microflora do alimento vivo de modo a evitar efeitos negativos nas larvas como a transmissão de uma carga bacteriana excessiva e, ao mesmo tempo, garantir o sucesso da colonização do trato intestinal (Nicolas *et al.*, 1989).

5. Conclusão

Demonstrou-se que o uso de copépodes preservados na alimentação de larvas de dourada (*Sparus aurata*) se adequa desde que numa substituição moderada, até 50%, não afetando negativamente o seu crescimento. Já na larvicultura de linguado (*Solea senegalensis*) os copépodes preservados não se mostraram uma dieta muito adequada na medida em que não se refletiu positivamente no crescimento devido à sua diminuta aceitação pelas larvas, o que leva à necessidade do melhoramento deste produto de modo a tornar as suas características mais atrativas. Em ambas as espécies, a utilização de copépodes preservados na dieta não condicionou a sobrevivência larvar.

As larvas de dourada apresentaram uma microbiota do trato digestivo dominada pelos géneros *Vibrio* e *Aeromonas*, sendo que outros géneros como *Photobacterium*, *Pantoea*, *Micrococcus* e *Listonella* também foram isolados independentemente da dieta fornecida. As larvas alimentadas com copépodes preservados apresentaram uma microbiota com maior carga bacteriana com $13,2 \pm 8,1 \times 10^2$ UFC larva⁻¹.

As larvas de linguado também exibiram uma microbiota dominada pelos géneros *Vibrio* e *Aeromonas*, sendo que também se isolou o género *Photobacterium*. A carga bacteriana da microflora do trato digestivo apresentou valores maiores para o grupo controlo com $6,7 \pm 0,6 \times 10^2$ UFC larva⁻¹, uma vez que este grupo, provavelmente, ingeriu uma maior quantidade de alimento dado que apresentou um crescimento significativamente maior.

No ensaio de alimentação em juvenis de *Solea senegalensis* a utilização de uma ração com 10% de copépodes não se mostrou muito adequada pois não se obtiveram bons resultados de crescimento. A microbiota intestinal destes juvenis é dominada por *Vibrio* sp. e *Aeromonas* sp. e outros géneros como *Photobacterium*, *Brevibacillus*, *Phenon 5* também foram isolados nos dois tratamentos (dieta com e sem copépodes). Apenas o género *Micrococcus* foi isolado do tratamento com copépodes e também foi este tratamento que apresentou uma carga bacteriana mais elevada com $38,5 \pm 22,8 \times 10^2$ UFC cm⁻¹.

Os copépodes constituem uma boa alternativa enquanto alimento vivo por serem uma excelente fonte de nutrientes essenciais para larvas e juvenis de peixes marinhos. A sua produção em larga escala como alimento vivo apresenta alguns constrangimentos daí a necessidade de se criar um produto preservado. No entanto, este produto pode não se adequar a todas as espécies, sendo necessário um melhoramento de modo a elevar a sua aceitabilidade por parte das larvas e dos juvenis.

6. Referências Bibliográficas

- Aragão, C., Conceição, L. E. C., Fyhn, H.-J. & Dinis, M. T. (2004). Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 242(1-4), 589–605.
- Austin, B. (2006). The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931–945.
- Avella, M., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C. & Carnevali, O. (2010). Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305(1-4), 12–19.
- Bergh, Ø., Naas, K. E. & Harboe, T. (1994). Shift in the intestinal microflora of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(8), 1899-1903.
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Hadisyde, N., Gatward, I. & Corner, R. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1554), 2897–912.
- Brunvold, L., Sandaa, R.A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H. & Bergh, Ø. (2007). Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture*, 272, 319-327.
- Buller, N. (2004). Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals – A Practical Identification Manual. CABI Publishing. 1-390.
- Burr, G., Gatlin, D. & Ricke, S. (2005). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4). 425-436.
- Busch, A. (1996). Transition from endogenous to exogenous nutrition – larval size parameters determining the start of external feeding and size of prey ingested by rügen spring herring, *Clupea harengus*, *Marine Ecology Progress Series*, 130 (1-3), 39-46.
- Carazo, I., Martin, I., Hubbard, P., Chereguini, O., Mañanós, E., Canário, A. & Duncan, N. (2011). Reproductive behaviour, the absence of reproductive behaviour in cultured (G1 generation) and chemical communication in the senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Indian Journal of Science and Technology*, 4, 96–97.
- Chakrabarti, I., Gani, Md. A., Chaki, K.K., Sur, R. & Misra, K.K. (1995). Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habits and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112A, 167–177.
- Clements, K.D. (1997). Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. *In: Gastrointestinal Microbiology, Vol. 1, Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Ed.: Mackie, R. J., White, B. A. & Isaacson, R. E. pp.: 156-198. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, NewYork, USA.
- Cobcroft, J.M., Pankhurst, P.M., Hart, P.R. & Battaglione, S.C. (2001). The effects of light intensity and algal-induced turbidity on feeding behaviour of larval striped trumpeter. *Journal of Fish Biology*, 59, 1181–1197.
- Cox, E.S. & Pankhurst, P.M. (2000). Feeding behaviour of greenback flounder larvae, *Rhombosolea tapirina* (Gunther) with differing exposure histories to live prey. *Aquaculture*, 183(3-4), 285–297.

- Delbare, D., Dhert, P., & Lavens, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, FAO Fisheries Technical Papers 361, Rome, 252–282.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. & Beev, G. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*, 1, 1–29.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. & Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176(1-2), 27–38.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Conceição, L.E.C. & Aragão, C. (2000). Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 47, 193–204.
- Engrola, S. (2008). Improving growth performance of Senegalese sole postlarvae. PhD Thesis. Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 1-167.
- Engrola, S., Mai, M.G., Dinis, M.T. & Conceição, L.E.C. (2009). Co-feeding of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 287, 185–190.
- FAO. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Ed.: Lavens, P. & Sorgeloos, P. University of Ghent, Belgium. 1-295.
- FAO. (2005-2013). Cultured Aquatic Species Information Programme, *Sparus aurata*. Text by Colloca, F. & Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 8 February 2005. [Citado a 15.05.2013].
- FAO. (2006). Fisheries statistics: Aquaculture production, 88/2. FAO, Rome, Italy, pp 12.
- FAO. (2013). Aquaculture Production Statistics for the year 2011. FAO Fisheries and Aquaculture Department. [online]. [Citado a 24.04.13]
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alárcon, F. J. & Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology*, 58, 1086–1097.
- Ferreira, P. M. P. (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*. IPIMAR. pp. 1-231.
- Froese, R. & Pauly, D. (2011). FishBase. World Wide Web electronic publication.
- Fukusho, K. (1980). Mass production of a copepod, *Tigriopus japonicus* in combination culture with a rotifer *Brachionus plicatilis* fed w-yeast as a food source. *Bulletin of Japanese Society for the Science of Fish*, 46, 625–629.
- Gómez, G.D. & Balcázar, J.L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52, 145–54.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P. & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 181–187.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., & Mañanós, E. L. (2009). Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*, 291(3-4), 200–209.
- Hansen, G. H. & Olafsen, J. A. (1999). Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microbial Ecology*, 38(1), 1–26.
- Howell, B.R. (1997) A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture*, 155, 359-369

- Howell, B., Cañavate, P., Prickett, R & Conceição, L. (2006). The cultivation of soles. Report of the 3rd workshop held at CIFPA “El Toruño”, Cadiz, Spain.
- Howell, B., Prickett, R., Cañavate, P., Mañanos E., Dinis, M. T., Conceição, L. & Valente, L. (2011). The cultivation of soles. Report of the 5th workshop held at CCMAR, University of the Algarve, Faro, Portugal.
- Igarashi, M.A., Sugita, H.& Deguchi, Y. (1989). Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 55, 2045.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. & White, P. (2004) A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13, 379-409.
- Kahan, D., Uhlig, G., Schwenzer, D. & Horowitz, L. (1982). A simple method for cultivating harpacticoid copepods and offering them to fish larvae, *Aquaculture* 26, 303–310.
- Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Moriñigo, M. A, & La Banda, I. G. (2013). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish physiology and biochemistry*. Published online: 11 August 2013
- Lupatsch, I. & Kissil, G. W. (2003). Defining energy and protein requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to optimize feeds and feeding regimes. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 55(4), 243–257.
- MacDonald, N.L., Stark, J.R. & Austin, B. (1986). Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of the Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbioly Letters*, 35, 107–111.
- Makridis, P., Fjellheim, J.A., Skjermo, J. & Vadstein, O. (2000). Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International*, 8, 367–380.
- Makridis, P., Martins, S., Tsalavouta, M., Catala, L., Magoulas, A., & Dinis, M. T. (2005). Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole , *Solea senegalensis* , fed with natural prey. *Aquaculture Research*, 36, 1619–1628.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastrì, R. (1999). *Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (FAO). 1–141.
- Munro, P.D., Barbour, A. & Birkbeck, T.H. (1994). Comparison of the gut bacterial-flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 560–566.
- Munro, P. D., Barbour, A. & Birkbeck, T. H. (1995). Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. *Applied and environmental microbiology*, 61(12), 4425–8.
- Nengas, I., Alexis, M.N. & Davies, S.J. (1996). Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture Research*, 27, 147–156.
- Nicolas, J.L., Robic, E. & Ansquer, D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83, 237–248.
- O'Brien, W.J. (1979). The Predator-Prey Interaction of Planktivorous Fish and Zooplankton. *American Scientist*, 67, 572–581.

Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F. & Carnevali, O. (2008). The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, 274, 347–352.

Olivotto, I., Tokle, N. E., Nozzi, V., Cossignani, L. & Carnevali, O. (2010). Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. *Aquaculture*, 308(3-4), 124–131.

Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P. & Gatta, P. P. (2011). Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture*, 321(3-4), 237–244.

Pedersen, T., Eliassen, J.E., Eilertsen, H.C., Tande, K.S. & Olsen, R.E. (1989). Feeding, growth, lipid composition and survival of larval cod (*Gadus morhua* L.) in relation to environmental conditions in an enclosure at 70°N in northern Norway. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil international pour l'Exploration de la Mer*, 191, 409–420.

Planas, M. & Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177, 171-190

Sánchez, P., Ambrosio, P. P. & Flos, R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 300(1-4), 93–101.

Savas, S., Kubilay, A. & Basmaz, N. (2005). Effect of bacterial load in feeds on intestinal microflora of seabream (*Sparus aurata*) larvae and juveniles. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 57(1), 3–9.

Schipp, G.R., Bosman, J.M.P. & Marshall, A.J. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174, 81–88.

Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R. & Sargent, J.R. (1999). Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *Journal of Nutrition*, 129, 1186–1194.

Subasinghe, R., Soto, D. & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1, 2-9.

Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö. & Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1-4), 140–145.

Vine, N. G., Leukes, W. D. & Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *Federation of European Microbiological Societies*, 30, 404–427.

Volkoff, H., Hoskins, L. J. & Tuziak, S. M. (2010). Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: potential application in aquaculture. *General and comparative endocrinology*, 167(3), 352–9.

Yúfera, M. & Darías, M. J. (2007). Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 267(1-4), 94–99.

Zar, J.H. (2009). *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ : Pearson Education International.

Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I. & Gaskins, H.R. (2004). Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *Journal of Nutrition*, 134, 465-472.

