



**O uso de ciliados *Euplotes* sp. em aquacultura ornamental:  
Otimização das condições de cultivo**

Catarina Rodrigues Mendes

2016





**O uso de ciliados *Euplotes* sp. em aquacultura ornamental:  
Otimização das condições de cultivo**

Catarina Rodrigues Mendes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Paulo Maranhão

2016



Título: O uso de ciliados *Euplotes* sp. em aquacultura ornamental: Otimização das condições de cultivo

*Copyright* © Catarina Rodrigues Mendes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2016

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

A ti meu querido avô, porque sei que te deixaria muito feliz!

À minha família que me apoia e me fez crescer a cada passo que dou e me ajuda a alcançar os meus sonhos.

A todos os meus amigos por toda a ajuda, apoio, e momentos de desconpressão: Catarina Barraca, Catarina Rosado Correia, Francisco Aguilar, Tânia Araújo, Cátia Fernandes e aos melhores piores colegas de casa Fábio Miranda e João Francisco.

A ti Emanuel!

Ao João Chambel pelo apoio incondicional, por tudo o que me ensinas-te por todos os momentos partilhados quer de trabalho quer de diversão.

À Vera Severiano por toda a disponibilidade e ajuda prestada quer na parte laboratorial quer nas correções e ao Duarte por toda a alegria e todos os momentos de brincadeira.

Aos meus “minions” João Lopes e Rui Calado por toda a ajuda na realização da parte prática desta tese.

À professora Susana Mendes por toda a paciência e auxílio prestado na correção da tese.

Ao doutor Paulo Maranhão pela disponibilidade de orientação e por todo o tempo despendido.

À AquaSpro!

E como não podia deixar de ser, à minha mãe, sem ti nada disto seria realizável e ao meu pai por me fazer querer superar e ser melhor a cada dia que passa!

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas na realização desta tese, um sincero obrigado!



**Resumo:**

Estima-se que menos de 10% dos animais marinhos comercializados para fins ornamentais sejam originários de produção em aquacultura. O desenvolvimento de “hatchery’s” de peixes de recife são essenciais para uma reprodução em cativeiro, confiável e sustentável, para que seja possível reduzir a pressão sobre as populações selvagens.

O principal entrave à aquacultura ornamental marinha é a criação de larvas, devido à dificuldade em obter um alimento vivo, uma vez que, estas são muito pequenas quando eclodem. Rotíferos e artémia são as presas vivas mais utilizados na produção de peixes marinhos, mas não são utilizadas para larvas de peixes ornamentais devido à sua dimensão. Recentemente, os ciliados *Euplotes* sp. surgiram como uma potencial presa viva estas para larvas, devido ao seu pequeno tamanho, podem preencher a lacuna existente entre a primeira alimentação e a aceitação de rotíferos ou náuplios de copépodes.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições de cultivo quer de alimentação (melhor alimentação, frequência e quantidade), fotoperíodo, salinidade e temperatura para a produção em massa de *Euplotes* sp.. Os principais resultados mostraram que as culturas de *Euplotes* sp. podem alcançar o seu crescimento ótimo com o fornecimento de 0,25 g/L de levedura de padeiro (*S.cerevisiae*) a cada três dias, salinidade 30, 28°C de temperatura, fotoperíodo de 12hLuz:12hEscuro, com arejamento constante.

Neste momento, o conhecimento sobre a produção em escala de ciliados é muito reduzido e este estudo veio fornecer, pela primeira vez, informações técnicas sobre as condições ideais para a produção em escala deste potencial alimento de larvas de peixes marinhos ornamentais.

Palavras-Chave: *Euplotes* sp.; Ciliados; Alimento vivo; Condições de cultivo; Aquacultura ornamental



**Abstract:**

It is estimated that less than 10% of marine animals marketed for ornamental purposes are originate from captive production. The development of reliable and sustainable hatchery procedures for the captive breeding of reef fishes is essential to reduce pressure on wild populations. The main critical bottleneck in marine ornamental aquaculture is the larval rearing with the major obstacle represented by the difficulty to obtain live foods for marine ornamental larvae that are very small at hatching and first feeding. Rotifers and brine shrimp are the most widely used live food items in marine fish culture but because their size they are not the best live preys for this marine ornamental larvae.

Recently, marine ciliates, *Euplotes* sp. have been suggested as a potential live prey for marine ornamental larvae, that because their small size, may bridge the gap between first feeding and the acceptance of rotifers or copepod nauplii.

The present work aimed optimize the culture conditions of feeding (best feed, frequency and quantity), photoperiod, salinity and temperature for the mass density production of *Euplotes* sp.. The main results showed that cultures of *Euplotes* sp. cultures can reach the optimal growth with 0,25 g/L of yeast baker (*S.cereviviae*) each three days, 30 salinity, 28°C, photoperiod (light:dark) of 12h:12h and with constant aeration.

At this moment the knowledge about mas scale production are very reduced this study provides for the first time technical information about the optimal conditions for the mass scale production of this new potential live feed for ornamental fish marine larvae.

Key-words: *Euplotes* sp.; Ciliates; Live feed; Culture conditions; Ornamental aquaculture



## Índice

---

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1. Introdução.....	1
2. Objetivos .....	7
3. Materiais e Métodos .....	9
3.1 Manutenção de stocks .....	9
3.2 Efeito de diferentes alimentos no cultivo de <i>Euplotes</i> sp. ....	9
3.3 Efeito da quantidade e frequência de alimentação ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	10
3.4 Efeito da quantidade de alimento ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	11
3.5 Efeito da frequência de alimentação ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	11
3.6 Quantidade letal de <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura .....	12
3.7 Efeito do fotoperíodo na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	13
3.8 Efeito da salinidade na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	13
3.9 Efeito da temperatura na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	14
3.10 Análise estatística .....	14
4. Resultados .....	17
4.1 Efeito de diferentes alimentos no cultivo de <i>Euplotes</i> sp. ....	17
4.2 Efeito da quantidade e frequência de alimentação ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	18
4.3 Efeito da quantidade de alimento ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	20
4.4 Efeito da frequência de alimentação ( <i>S. cerevisiae</i> ) na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	21
4.5 Quantidade letal de <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura .....	22
4.6 Efeito do fotoperíodo na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	23
4.7 Efeito da salinidade na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	24
4.8 Efeito da temperatura na densidade de <i>Euplotes</i> sp. ....	25
5. Discussão .....	27
6. Conclusão e Perspetivas futuras.....	35
7. Referências Bibliográficas .....	37



---

**Índice de figuras**

Figura 4.1- Densidade de ciliados (ind/mL) alimentados com os diferentes alimentos em estudo, ao longo do tempo (12 dias). Os valores correspondem à média±DP (n=3).....	17
Figura 4.2 - Compostos azotados, amônia total e nitritos (mg/L) ao longo do ensaio (12 dias). Os valores correspondem à média ±DP (n=3). .....	18
Figura 4.3 – a) Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura ( <i>S. cerevisiae</i> ) em diferentes condições testes de frequência e quantidade de alimentação; b) Quantidade de alimento (g/L) acumulada longo do tempo (12 dias) nas diferentes condições testes de frequência e quantidade de alimentação. Os valores correspondem à media±DP (n=4). .....	19
Figura 4.4 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura ( <i>S. cerevisiae</i> ) em diferentes quantidades. Os valores correspondem à média±DP (n=4).....	21
Figura 4.5 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura ( <i>S. cerevisiae</i> ) nas diferentes frequências de alimentação em estudo. Os valores correspondem à média±DP (n=4).....	21
Figura 4.6 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (3 dias), alimentados com levedura ( <i>S. cerevisiae</i> ) em diferentes quantidades a partir de uma densidade inicial de cerca de 8000 ind./ml Os valores correspondem à média ±DP (n=4). .....	22
Figura 4.7 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes fotoperíodos. Os valores correspondem à média±DP (n=4). .....	23
Figura 4.8 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes salinidades. Os valores correspondem à média±DP (n=4).....	24
Figura 4.9 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes temperaturas. Os valores correspondem à média±DP (n=4).....	25



**Índice de tabelas**

Tabela III.I - Quantidade de alimento ( <i>S. cerevisiae</i> ) e frequência de administração nos diferentes tratamentos. ....	10
Tabela III.II - Quantidade de alimento ( <i>S. cerevisiae</i> ) administrada nos diferentes tratamentos. ....	11
Tabela III. III - Frequências de administração de alimento ( <i>S. cerevisiae</i> ) nos diferentes tratamentos. ....	12
Tabela III. IV – Quantidade de alimento ( <i>S.cerevisiae</i> ) a administrar nos diferentes tratamentos após atingir a densidade de cultivo de 8000 ind/mL. ....	12



## 1. Introdução

A aquariofilia é um dos hobbies mais praticados em todo o mundo e tem crescido sustentadamente nos últimos anos (Dhar e Ghosh, 2015). A aquariofilia é uma indústria que move milhões a nível internacional e continua em expansão, estima-se que em 2015 tenha rondado os 8 biliões de dólares só a nível de comércio de peixes ornamentais e cerca de 20 biliões se for incluída toda a logística envolvente à atividade, desde aquários, plantas, acessórios, alimentação, medicamentos, etc. (Kumar *et al.*, 2015; Madhu *et al.*, 2016).

As espécies ornamentais são definidas por serem capazes de ser mantidas em ambientes artificiais com o único propósito de entretenimento (Cunha, 2006), tendo um conjunto de características únicas que fazem com que se tornem mais atraentes para os apreciadores.

Segundo Leal *et al.* (2016), todos os anos, são comercializadas aproximadamente 30 milhões de peixes ornamentais marinhos pertencentes a cerca de 1800 espécies diferentes, mas apenas 72 dessas espécies são produzidas em cativeiro, sendo todas as outras capturadas no meio natural (Wabnitz *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2011), um número pouco significativo quando comparado com as espécies de água doce, das quais mais de 90% são produzidas em cativeiro (Green, 2003; Pomeroy *et al.*, 2006).

Este elevado número de capturas implica um esforço intensivo de pesca de forma a dar resposta à procura do mercado ornamental. Em países como as Filipinas e Indonésia (maiores exportadores de peixes ornamentais marinhos do mundo) foi usada, durante décadas e de forma indiscriminada, a pesca através de dinamite e cianeto (Barber e Pratt, 1998; Wabnitz *et al.*, 2003; Dee *et al.*, 2014). Para além disso, estima-se que desde a captura até ao comprador final, entre 60 a 80% dos animais morram, devido às más práticas de manuseamento (Sadovy e Vincent, 2002). A causa mais comum tem a ver com a captura, pois é normal ocorrerem perfurações na bexiga natatória, devido a acelerações de descompressão durante a subida e o uso de técnicas agressivas de captura (Côrtes, 2009). Parte dos peixes que sobrevivem a esta primeira fase enfrentam um novo desafio logo de seguida, pois na maioria dos casos os peixes capturados são de imediato embalados e enviados para os intermediários, que geralmente estão entre 24 a 72 horas de distância, sem que tenha havido qualquer tipo de quarentena, traduzindo-se este processo em elevadas taxas de mortalidade. Devido a estas causas, o número de peixes selvagens capturados é muito superior ao número real de peixes que chegam ao consumidor final. Esta pesca, ecologicamente insustentável e descontrolada, colocou em risco, nos últimos anos os stocks

naturais de várias espécies ornamentais marinhas, colocando em risco todo o ecossistema (Wabnitz *et al.*, 2003). Neste sentido, urge a necessidade de preservar estes ecossistemas, pois as zonas de recife são o epicentro da biodiversidade marinha global (Coker *et al.*, 2014). Desta forma, o cultivo das espécies de peixes comumente comercializadas no mercado ornamental representa uma ferramenta ecológica, muito importante para o desenvolvimento sustentável do hobby da aquariofilia marinha (Moorhead, 2014). Apesar da comunidade científica, na última década, ter virado as atenções para esta problemática e o conhecimento hoje ser bastante rico comparativo com o passado, ainda muito está por descobrir e é essencial o desenvolvimento e otimização de protocolos de produção em cativeiro de forma a diminuir a dependência do mercado de peixes ornamentais marinhos da captura de espécimes selvagens (Tlusty 2002; Pomeroy *et al.*, 2006).

Atualmente, os principais problemas na produção de espécies ornamentais em aquacultura centram-se na fase de desenvolvimento larvar. É a fase do ciclo de vida mais delicada e com uma maior taxa de mortalidade associada. Requerendo por isso, mais cuidados principalmente quando as larvas esgotam as suas reservas vitelinas e dão início à captura e ingestão de alimento exógeno (Côrtes e Tsuzuki, 2010).

Na natureza, as larvas nas primeiras semanas de vida, alimentam-se de uma grande variedade de zooplâncton que as correntes oceânicas transportam que inclui protozoários (ciliados), dinoflagelados, larvas de moluscos e náuplios de copépodes (Holt e Holt 2000). Eleggem as suas presas de acordo com o tamanho e atração visual que lhes causam (quer pelo comportamento natatório ou pela cor). A preferência das larvas é também adaptada às suas características morfológicas, principalmente o tamanho da boca e as suas necessidades nutricionais, sendo isto variável de espécie para espécie (Côrtes, 2009). Por essa razão e para que esta fase tenha sucesso em aquacultura, é necessário simular o meio natural administrando-lhes o alimento adequado e na quantidade necessária (Laurel *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2005).

A alimentação das larvas nos primeiros dias é geralmente feita com recurso a alimento vivo, comumente os protocolos para a maioria das espécies marinhas incluem no plano alimentar o fornecimento numa fase inicial de rotíferos, *Brachionus* sp., seguidos de náuplios e metanáuplios de artémia *Artemia* sp., (Cheng *et al.*, 2004). Em ambos os casos, a qualidade nutricional destes organismos são o espelho da sua alimentação, ou seja, apenas podem ser usados como alimento com sucesso se forem previamente enriquecidos, podendo funcionar

como “cápsula viva”, o chamado processo de bioencapsulação, uma vez que é possível fornecer aquilo que se pretende dar aos cultivos larvares através do enriquecimento destes mesmos organismos. O processo de bioencapsulação ou enriquecimento é uma forma de cumprir os requisitos nutricionais das larvas, enriquecendo a dieta do ponto de vista nutritivo garantindo assim o adequado desenvolvimento larvar, podendo também serem administrados antibióticos por esta via (Roiha *et al.*, 2011). É comum a utilização de microalgas ou emulsões comerciais (como SELCO 3000® ou Red Pepper®) ricas em lípidos essenciais para as larvas. Este processo já é muito recorrente em larviculturas marinhas, quer para a artémia quer para os rotíferos. (Shei *et al.*, 2012).

Os rotíferos (*Brachionus* sp.) são organismos zooplanctónicos herbívoros de tamanho reduzido, variando entre 130 e 340 µm na espécie *B. plicatilis* e 100 e 210 µm em *B. rotundiformis*. A sua produção é relativamente simples, mas pode ser afetada por alguns fatores tais como: variações de temperatura ou salinidade do cultivo, acumulação de substâncias excretoras (amónia) ou ainda a interação com microrganismos, como bactérias ou protozoários, sendo os ciliados do género *Euplotes* os protozoários mais comuns (Maeda e Hino, 1991).

*Artemia* sp. são pequenos crustáceos amplamente utilizados no cultivo de peixes, tendo a grande vantagem de se poder armazenar os cistos durante vários anos e colocá-los a eclodir nas condições ótimas sempre que necessário (Fujita *et al.*, 1980; Navarro *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, apareceram no mercado várias qualidades de cistos de artémia, que variam no tamanho dos náuplios, podendo nas diferentes qualidades de artémia variar os náuplios entre os 430 e os 500 µm (Van *et al.*, 2014). Neste sentido mesmo em fase de náuplios, têm a desvantagem de serem muito grandes para alimentar as fases larvares iniciais, além disso, os estágios iniciais de muitas larvas de peixes marinhos não têm o sistema digestivo totalmente desenvolvido e, por isso, é necessária a suplementação com enzimas alimentares através da alimentação fornecida (Vagelli, 2004; Ronnestad *et al.*, 2007).

As larvas da maioria das espécies ornamentais marinhas são em geral muito pequenas, tendo cerca de 2 mm e com uma abertura de boca reduzida que não permite utilizar rotíferos ou artémia como primeiro alimento (Sazima *et al.*, 1997; Olivotto *et al.*, 2005; Côrtes e Tsuzuki, 2012; Olivotto *et al.*, 2016).

Com a necessidade da produção em cativeiro de novas espécies, nos últimos anos tem-se observado um esforço para o estabelecimento de protocolos de manutenção e reprodução de

espécies que reúnam condições para serem utilizadas como primeiro alimento para as fases larvares de espécies ornamentais marinhas.

Esta procura incessante pelo alimento vivo ideal para as larvas de peixes marinhos baseia-se nos seguintes requisitos (Hunt Von Herbing e Gallagher, 2000; Côrtes e Tsuzuki, 2010; Saravanan *et al.*, 2013):

- 1- Ter o tamanho adequado para a captura e ingestão pelas larvas.
- 2- Exercer atividade natatória que estimule as larvas a terem ação predatória sobre a presa.
- 3- Ter um cultivo simples e possível de se transpor à escala industrial.
- 4- Ter o ciclo reprodutivo com apenas alguns dias de duração para que seja possível alcançar elevadas densidades de forma rápida.
- 5- Conter os nutrientes necessários para o correto desenvolvimento das larvas ou a possibilidade de poder ser enriquecido.
- 6- Ter uma variação de tamanho corporal de forma a garantir a correta alimentação de uma ampla gama de tamanhos durante o desenvolvimento larvar.

Um dos grupos de organismos que tem chamado à atenção da comunidade científica com o seu potencial para a utilização na alimentação de fases larvares é o dos copépodes. Pensa-se que o fornecimento de náuplios de copépodes, como primeiro alimento vivo pode ser mais adequado para muitas espécies de larvas de peixes marinhos (Dutz e Peters, 2008; Côrtes e Tsuzuki, 2012), porque algumas dessas espécies (p.ex. *Acartia tonsa*) têm uma ampla gama de tamanhos corporais, entre os 50 e 70  $\mu\text{m}$ , no início do estágio larvar (menores dimensões que a artémia ou rotíferos), até aos 700  $\mu\text{m}$  em adulto e têm excelentes qualidades nutricionais. No entanto, os copépodes têm a desvantagem de terem um ciclo reprodutivo longo e as técnicas de cultivo e os seus protocolos não estarem otimizadas de forma a terem um cultivo prático em condições controladas (Støttrup e Mcevoy, 2003; Drillet e Dutz, 2014).

Adicionalmente e embora do ponto de vista nutritivo os copépodes possam ter grandes vantagens comparativamente com rotíferos e artémia, organismos com cerca de 50 a 70  $\mu\text{m}$ , o cultivo de copépodes é ainda um desafio, sendo reconhecida a dificuldade em cultivar estes organismos em elevadas densidades necessárias para produzir peixes ornamentais marinhos em larga escala.

Nos últimos anos, surgiu a hipótese de se utilizar um organismo vivo como primeiro alimento para larvas de peixe de pequenas dimensões, os ciliados (Nagano *et al.*, 2000a). Os ciliados são constituintes do zooplâncton, por isso, ocupam uma importante posição na cadeia trófica alimentar marinha, principalmente, devido à sua abundância e ao seu tamanho (Côrtes *et al.*, 2013). Fazem parte de 30 a 50 % da produção primária em muitos sistemas marinhos e podem ser o grupo dominante de micro zooplâncton em águas costeiras temperadas (Pierce e Turner, 1992). Em aquacultura ocorrem comumente como contaminação em culturas de microalgas e rotíferos (Jung, 2012).

Os ciliados *Euplotes* sp. têm dimensões variáveis entre 20µm e 40µm, e um corpo elíptico alongado em forma de “D” rodeado por cílios que auxiliam na sua locomoção e alimentação. Tipicamente, os ciliados alimentam-se de bactérias, microalgas e absorvem nutrientes a partir do ambiente aquático envolvente. A sua estrutura celular é formada por vacúolos (alimentares e excretos) e um núcleo. Têm uma rápida reprodução, que ocorre por bipartição ao longo da zona de menor largura da célula. (Chen *et al.*, 2014). Quando se encontram em condições adversas têm a capacidade de formar cistos. Cercam-se por uma camada protetora que os mantém vivos, num estado de letargia. Quando as condições ambientais são favoráveis os cistos hidratam e a camada protetora dissolve-se. As espécies deste género são distinguidas morfológicamente por uma combinação de características, tais como: tamanho, forma do corpo e número de saliências dorsais e ventrais. O habitat também influencia esta distinção (Chen *et al.*, 2014).

Os ciliados *Euplotes* sp. apesar de não terem um perfil nutricional com todos os nutrientes essenciais ao correto desenvolvimento larvar, têm a capacidade de serem enriquecidos, uma vez que são filtradores não seletivos (Drillet e Dutz, 2014). Sabe-se que já foram administrados com sucesso, como primeira alimentação, em algumas larvas de peixes ornamentais (Nagano *et al.*, 2000b; Olivotto *et al.*, 2005). Embora o potencial para serem utilizados como alimento nas primeiras fases de vida de larvas de peixes ornamentais, seja enorme, à data não existem protocolos otimizados para a produção destes organismos para utilização em aquacultura.



## 2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo definir as condições favoráveis para a produção em massa de ciliados *Euplothes* sp., criando assim uma forma sustentável de produção de um alimento vivo com grandes potencialidades para larvas de peixes ornamentais. Para isso, foi necessário definir os principais parâmetros de cultivo, tais como:

- Alimentação
- Frequência e quantidade de alimento
- Fotoperíodo
- Salinidade
- Temperatura

Com todos os parâmetros do cultivo otimizados, o objetivo seguinte foi transpô-los à escala industrial aumentando, progressivamente, os volumes de produção.



### 3. Materiais e métodos

Os materiais e métodos utilizados no decorrer deste estudo encontram-se descritos nos seguintes subcapítulos.

#### 3.1 Manutenção de stocks

Os ciliados, *Euplotes* sp. foram recolhidos através de processos de crivagem de culturas de rotíferos contaminadas. Após serem crivados foram transferidos para um erlenmeyer com água autoclavada, tendo sido feitas repicagens sucessivas, de forma a criar a cultura stock livre da presença de outros microorganismos.

O stock de ciliados durante todo o processo foi mantido a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade controlada de  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12hLuz:12hEscuro. Foi mantido em densidades baixas ( $<200\text{ind/mL}$ ) de forma a evitar risco de perda de organismos. As culturas foram monitorizadas e alimentadas semanalmente, com o alimento fornecido às culturas de rotíferos, microalga viva (*Nannochloropsis oculata*) a uma densidade de  $2,2\times 10^6$  células/ml. Os ciliados foram contados utilizando uma câmara de Sedgewick-Rafter (Pyser-Sgi, Reino Unido) ao microscópio trinocular (Axiolab A1, Zeiss, Alemanha), com uma ampliação de 100X. Para a contagem recolheu-se um 1mL da amostra, colocou-se na câmara e foram fixados com 1 gota de formalina 10%, de forma a ser possível contar os organismos com mais exatidão.

O cultivo de microalga viva, *Nannochloropsis oculata*, foi inoculado a partir de um stock puro e mantido em meio F2 com arejamento constante a uma temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade controlada de  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro.

#### 3.2 Efeito de diferentes alimentos no cultivo de *Euplotes* sp.

Com o objetivo de determinar quais os alimentos que podem ser utilizados para o crescimento de culturas de *Euplotes* sp., testaram-se três dietas vulgarmente utilizadas em rotíferos: T1) Culture SELCO 3000 (InveAquaculture, Bélgica); T2) levedura fresca *Saccharomyces cerevisiae* e T3) microalga *Nannochloropsis oculata*.

Os ciliados, *Euplotes* sp., foram inoculados numa concentração de 10 ind/mL em 9 balões de 1L (3 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante 12 dias as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro. Os ciliados foram alimentados a cada dois dias de acordo com as concentrações estabelecidas: levedura e SELCO 0,5 g/milhão de indivíduos e a microalga mantida numa concentração de  $2,2\times 10^6$  células/ml. A densidade foi monitorizada diariamente, através de contagens.

A monitorização da qualidade de água (amónia e nitritos) foi feita diariamente recorrendo-se a testes fotométricos utilizando um fotómetro de bancada multiparamétrico para aquacultura (HI83203-02, Hanna, Italy).

Após este ensaio, os a seguir descritos, foram realizados com uma alimentação com levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.3 Efeito da quantidade e frequência de alimentação (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.

Com o intuito de otimizar o cultivo de *Euplotes* sp., é importante otimizar a quantidade e a frequência de administração do alimento. Nesse sentido, testaram-se 4 formas diferentes de alimentação, (tabela III.I) fazendo-se variar a quantidade e a frequência de alimento a administrar:

Tabela III.I - Quantidade de alimento (*S. cerevisiae*) e frequência de administração nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Frequência de alimentação	Quantidade de alimento (g levedura/ milhão de indivíduos)
T1	Diariamente	0,5
T2	Diariamente	0,25
T3	2 em 2 dias	0,5
T4	2 em 2 dias	0,25

Para tal, os ciliados, foram inoculados numa concentração de 10 ind/mL em 16 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante 12 dias as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12hLuz:12hEscuro. O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado através de contagens diárias da densidade de ciliados.

### 3.4 Efeito da quantidade de alimento (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.

Com o objetivo, de testar o fornecimento de uma quantidade de alimento (*S. cerevisiae*) constante ao longo do tempo, ao invés de uma alimentação proporcional ao número de organismos, foram testadas as seguintes condições, descritas na tabela III.II:

Tabela III.II - Quantidade de alimento (*S. cerevisiae*) administrada nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Frequência de alimentação	Quantidade de alimento
T1	Diariamente	0,5 g/L
T2	Diariamente	0,25 g/L
T3	Diariamente	0,5 g/milhão de indivíduos

Inocularam-se os ciliados numa concentração de 10 ind/mL em 12 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante 12 dias as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade  $30\pm 1$  e com fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro. O tratamento T3 serviu apenas como controlo. O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado através de contagens diárias da densidade de ciliados.

### 3.5 Efeito da frequência de alimentação (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.

Para perceber qual a regularidade de alimentação mais eficiente para as culturas de *Euplotes* sp. experimentaram-se 3 frequências de alimentação diferentes, em que a quantidade de

alimento fornecida ao longo do tempo foi proporcionalmente a mesma, só se fazendo variar a frequência com que era fornecida (Tabela III.III):

Tabela III. III - Frequências de administração de alimento (*S. cerevisiae*) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Frequência de alimentação	Quantidade de alimento
T1	Diariamente	0,25 g/L
T2	3 em 3 dias	0,75 g/L
T3	6 em 6 dias	1,5 g/L

Os ciliados, foram inoculados numa concentração de 10 ind/mL em 12 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante 12 dias as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro. O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado através de contagens diárias de ciliados.

### 3.6 Quantidade letal de *S. cerevisiae* no meio de cultura

De forma a testar a quantidade de levedura que pode ser letal para uma cultura de ciliados *Euplotes* sp., estes foram inoculados numa concentração de 10 ind/mL em 20 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada.

Os ciliados foram alimentados diariamente com 0,25g/L de *S. cerevisiae*, durante 7 dias até atingirem a densidade próxima de 8000 ind/mL. A partir deste momento, iniciou-se uma alimentação distinta, em que diariamente eram fornecidas as seguintes quantidades (tabela III.IV)

Tabela III. IV – Quantidade de alimento (*S.cerevisiae*) a administrar nos diferentes tratamentos após atingir a densidade de cultivo de 8000 ind/mL.

Tratamento	Quantidade da alimentação
T1	0,25 g/L
T2	1 g/L
T3	2 g/L
T4	3 g/L
T5	4g/L

Durante 12 dias as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com salinidade  $30\pm 1$  e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro. O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado através de contagens diárias da densidade de cultivo.

### **3.7 Efeito do fotoperíodo na densidade de *Euplotes* sp.**

Com o intuito de perceber a influência do fotoperíodo no crescimento de *Euplotes* sp. alimentados com *S. cerevisiae*, estes foram inoculados a uma concentração inicial de 10 ind/mL em 12 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Foram mantidos durante o decorrer dos 12 dias com 3 fotoperíodos diferentes: T1) 24 horas Luz, T2) 12hLuz:12hEscuro e T3) 24 horas Escuro. A temperatura e a salinidade foram mantidas de forma constante em todas as condições teste ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $30\pm 1$ , respetivamente). Os tratamentos foram realizados em quadruplicado. Diariamente, avaliou-se a densidade da cultura através de contagens e a alimentação de 0,75g/L de levedura, foi fornecida a cada três dias.

### **3.8 Efeito da salinidade na densidade de *Euplotes* sp.**

De forma a testar qual a salinidade mais adequada para o crescimento de ciliados *Euplotes* sp. foram inoculadas culturas com salinidades de 20, 25, 30 e 35. Tal como anteriormente, a cultura iniciou-se com 10 ind/mL em 16 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante o decorrer do ensaio as culturas foram mantidas com arejamento constante, à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro. Os ciliados foram alimentados com 0,75g/L de levedura *S.cerevisiae* fornecida a cada três dias. Diariamente, avaliou-se a densidade das culturas através de contagens na câmara de Sedgewick-Rafter, a salinidade medida com o auxílio de um refratómetro (HI 96822, Hanna, Italy) e acertada quando necessário com a adição de água destilada esterelizada.

### 3.9 Efeito da temperatura na densidade de *Euplotes* sp.

Para avaliar a temperatura que promove um maior crescimento de ciliados *Euplotes* sp. em meio controlado, recorreu-se a 4 temperaturas diferentes: 20°C, 23°C, 25°C e 28°C. Os ciliados foram inoculados a uma concentração inicial de 10 ind/mL em 16 balões de 1L (4 réplicas por tratamento) com água previamente autoclavada. Durante os 12 dias do ensaio, as culturas foram mantidas com arejamento constante e em condições controladas com fotoperíodo 12 horas luz 12 horas escuro e salinidade 30±1. Os ciliados foram alimentados com 0,75g/L de levedura *S.cerevisiae*. fornecida a cada três dias. Diariamente, foi avaliada a densidade do cultivo através de contagens.

### 3.10 Análise estatística

Os resultados apresentam-se sob a forma de média ± desvio-padrão (DP). Com o objetivo de estudar a influência da alimentação (SELCO 3000, levedura *S. cerevisiae* e *Nannochloropsis oculata* microalga, ou seja, ensaio 3.1), da quantidade (0,5g/L, 0,25g/L e 0,25 g/milhão de indivíduos, ou seja, ensaio 3.3), da frequência (diariamente, 3 em 3 dias e de 6 em 6 dias, ou seja, ensaio 3.4), da quantidade letal de alimento (0,5; 1; 2; 3 e 4 g/L ou seja, ensaio 3.5), do fotoperíodo (24h luz, 12hLuz:12hEscuro e 24h escuro, ou seja, ensaio 3.6) e da temperatura (20°, 23°, 25° e 28°C ou seja, ensaio 3.7) na densidade dos indivíduos, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com um fator (Zar, 2009). De igual modo, o mesmo procedimento foi realizado para o ensaio 3.2, ou seja, quando estudadas as diferentes condições de frequência e quantidade (0,5 g/milhão de indivíduos diariamente; 0,25 g/milhão de indivíduos diariamente; 0,5 g/milhão indivíduos de 2 em 2 dias e 0,25 g/milhão de indivíduos de 2 em 2 dias). Por outro lado, e dentro do estudo da alimentação (isto é, incluído no ensaio 3.1), a mesma metodologia foi aplicada, por forma a avaliar a qualidade da água (nomeadamente, nitritos e amónia), quando comparadas as três dietas em análise (SELCO 3000, levedura *S. cerevisiae* e *Nannochloropsis oculata* microalga, ou seja, ensaio 3.1).

Todos os pressupostos inerentes à realização do método foram devidamente validados (nomeadamente, a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias). Sempre que

adequado foi utilizado o teste de comparações múltiplas Tukey. Nos casos em que a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias não se verificou, foi utilizado o teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Games-Howell (Games e Howell 1976; Kirk 1982). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% (isto é, sempre que  $p\text{-value} < 0,05$ ). Os resultados foram processados e analisados com o software estatístico IBM SPSS statistics 23 e a elaboração gráfica através do programa Graph Pad Prism 5.



## 4. Resultados

Os resultados obtidos neste estudo apresentam-se nos seguintes subcapítulos.

### 4.1 Efeito de diferentes alimentos no cultivo de *Euplotes* sp.

Este ensaio teve como objetivo verificar qual dos 3 alimentos em estudo: T1) Culture SELCO 3000 T2) levedura *Saccharomyces cerevisiae* e T3) microalga *Nannochloropsis oculata*, possibilita produzir ciliados em elevadas densidades. Os resultados encontram-se na figura 4.1.

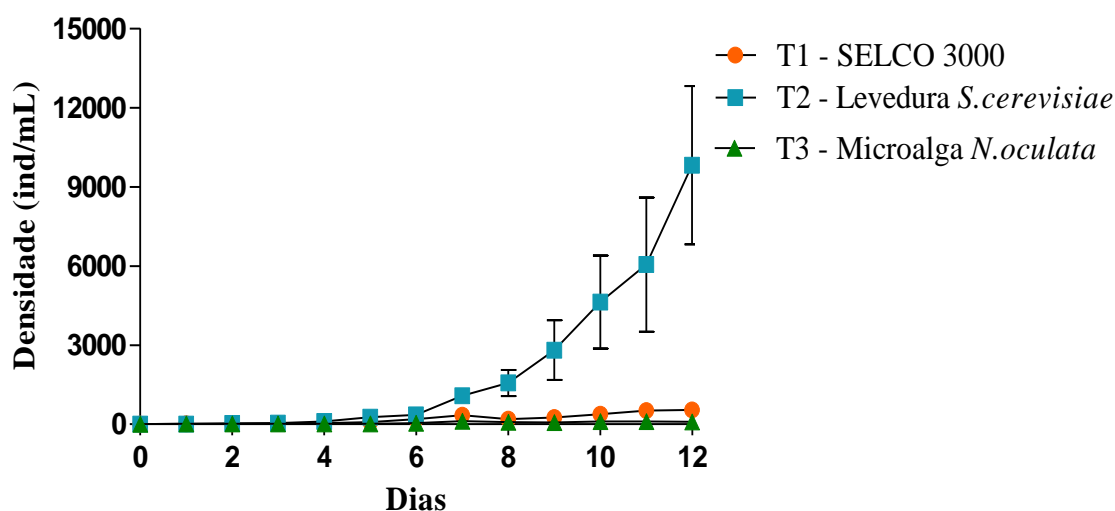


Figura 4.1- Densidade de ciliados (ind/mL) alimentados com os diferentes alimentos em estudo, ao longo do tempo (12 dias). Os valores correspondem à média±DP (n=3).

É possível observar que o alimento que promoveu uma maior densidade de ciliados foi a levedura, existindo diferenças estatisticamente significativas no crescimento, quando comparadas com as outras dietas (p-value <0,05). Estas diferenças começaram a ser notórias a partir do 8º dia de ensaio.

Após 12 dias de ensaio, a cultura alimentada com levedura atingiu uma densidade de  $9819 \pm 2996$  ind/mL, seguida pelo cultivo alimentado com Selco que atingiu uma densidade de  $547 \pm 57$  ind/mL e por fim, o grupo alimentado com microalga, que foi o que atingiu a densidade mais baixa de  $88 \pm 17$  ind/mL.

Na figura 4.2 observa-se a variação dos parâmetros da qualidade da água durante o decorrer do ensaio, 12 dias, no qual não se realizaram trocas de água.

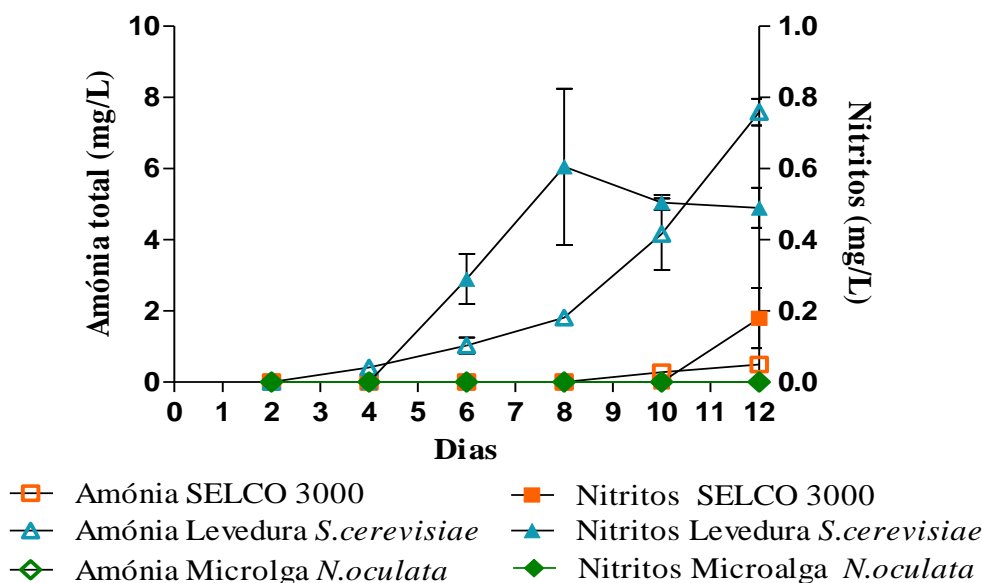


Figura 4.2 - Compostos azotados, amónia total e nitritos (mg/L) ao longo do ensaio (12 dias). Os valores correspondem à média  $\pm$ DP (n=3).

Observa-se que a qualidade da água é sempre inferior no tratamento com levedura, isto porque a amónia a partir do 4º dia começa a aumentar, atingindo  $7,5 \pm 0,37$  mg/L, no final do ensaio. Os nitritos começam a aumentar a partir do 6º dia, obtendo-se um valor máximo de  $0,60 \pm 0,2$  mg/L ao 8º dia de ensaio, mantendo-se relativamente estáveis até ao final. Em relação ao Selco a partir do 10º dia, são registados valores de amónia e nitritos vestigiais, ainda que sejam superiores aos valores obtidos na cultura alimentada com microalga. Ambos, são muito inferiores, comparativamente aos valores atingidos com a alimentação de levedura, sendo notáveis diferenças estatisticamente significativas (p-value < 0,05).

#### 4.2 Efeito da quantidade e frequência de alimentação (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.

Este ensaio teve como objetivo verificar o efeito da quantidade de levedura e da frequência de administração na densidade de ciliados *Euplotes* sp.. Foram, por isso, testadas 4

combinações de quantidade e frequência: T1) 0,5 g/milhão ind., diariamente; T2) 0,25 g/milhão ind., diariamente; T3) 0,5 g/milhão ind., 2 em 2 dias e T4) 0,25 g/milhão ind., 2 em 2 dias. Os resultados encontram-se descritos na figura 4.3.

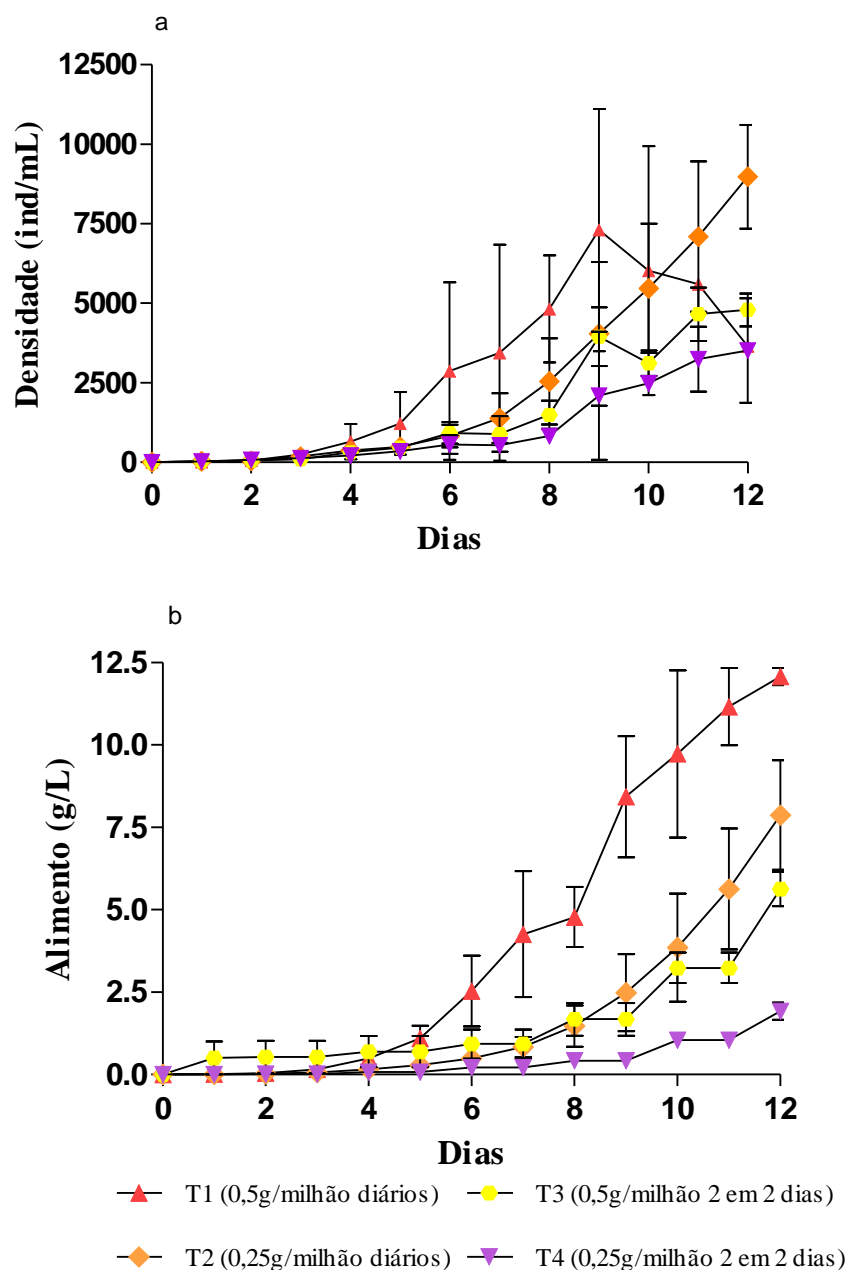


Figura 4.3 – a) Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura (*S. cerevisiae*) em diferentes condições; b) Quantidade de alimento (g/L) acumulada ao longo do tempo (12 dias) nas diferentes condições. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

Como é possível verificar, na figura 4.3 a) a partir do 5º dia as culturas de ciliados alimentadas com 0,5 g/ milhão de indivíduos (T1) de levedura todos os dias têm em média uma maior densidade comparando com os restantes tratamentos em estudo atingindo ao 9º dia uma concentração de  $7302 \pm 3810$  ind/ml, comparativamente com a densidade de  $4041 \pm 2256$  ind/ml em T2,  $3947 \pm 917$  ind/ml em T3 e  $2093 \pm 2011$  ind/ml em T4.

No entanto, após o 9º dia neste tratamento (T1) verifica-se uma diminuição abrupta da densidade de ciliados. Pelo contrário, em T2, a densidade continua a aumentar enquanto T3 e T4 apresentam um menor crescimento com tendência para estabilizar a concentração. Ao final dos 12 dias de ensaio o tratamento onde foi administrado 0,25g/milhão de ciliados todos os dias (T2) foi o que obteve uma maior densidade relativamente aos restantes tratamentos (p-value <0,05).

Quando se analisa a quantidade de alimento administrada ao longo de todo o ensaio, ou seja, a quantidade de alimento acumulado, e a densidade de indivíduos (Fig. 4.3b), percebe-se que, T1 foi o tratamento onde foi administrado maior quantidade de alimento seguindo-se de T2, T3 e T4. No final do ensaio, a quantidade de alimento acumulada foi de  $12,08 \pm 0,37$ g (T1),  $7,87 \pm 1,65$ g (T2),  $5,63 \pm 1,04$ g (T3) e  $1,92 \pm 0,52$ g (T4). Sendo que o dia em que foi administrada maior quantidade de alimento por tratamento foi o dia 12 em T1 ( $12,08 \pm 0,37$ g).

### **4.3 Efeito da quantidade de alimento (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.**

Com o ensaio anterior, percebeu-se que o método de alimentação baseado na quantidade de indivíduos (g/milhão ind) não seria o melhor, por isso, testou-se uma alimentação fixa, ou seja em g/L, independentemente da densidade de indivíduos. Os resultados encontram-se apresentados na figura 4.4.

Como se observa, em T1 e T2 atingem-se densidades superiores em comparação ao tratamento em que a alimentação foi dada de acordo com a densidade de indivíduos no meio. O valor máximo atingido em T1 foi  $22622 \pm 5154$  ind/mL, em T2 foi  $17858 \pm 1627$  ind/mL, enquanto que no T3 ficou pelos  $8981 \pm 1627$  ind/mL, como tal é notória a existência de diferenças estatisticamente significativas (p-value <0,05) a partir do 10º dia em T1 e T2 com T3. Em T1 e T2 não se verificam diferenças estatisticamente significativas ao longo do ensaio (p-value >0,05).

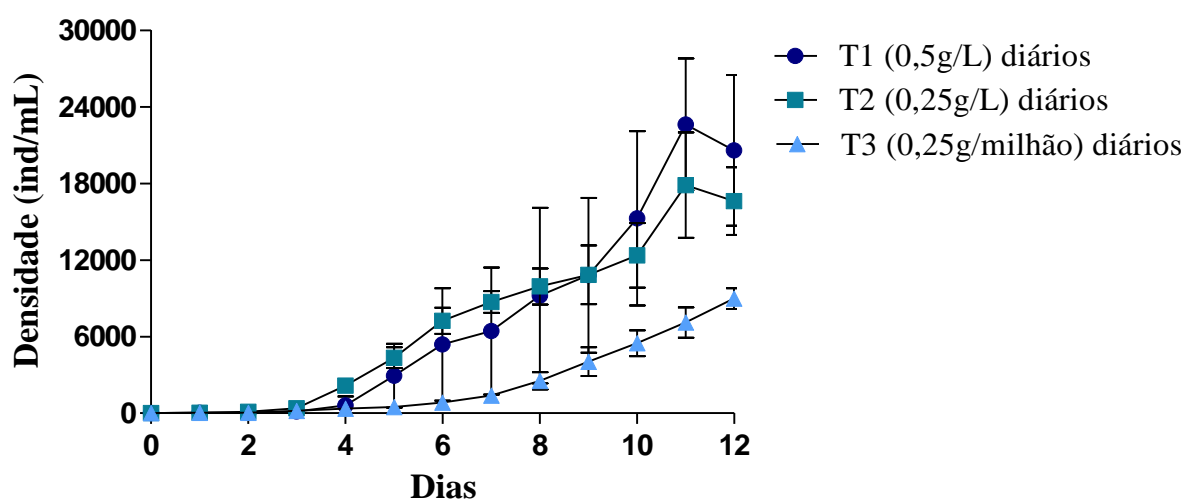


Figura 4.4 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura (*S. cerevisiae*) em diferentes quantidades. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

#### 4.4 Efeito da frequência de alimentação (*S. cerevisiae*) na densidade de *Euplotes* sp.

Uma forma importante de otimizar o cultivo de *Euplotes* sp. foi perceber qual seria a frequência mais correta de alimentação, isto é, de quanto em quanto tempo é necessário fornecer alimento com o intuito de se obter maiores densidades com um menor gasto possível. Os resultados referentes à frequência de alimentação encontram-se na figura 4.5.

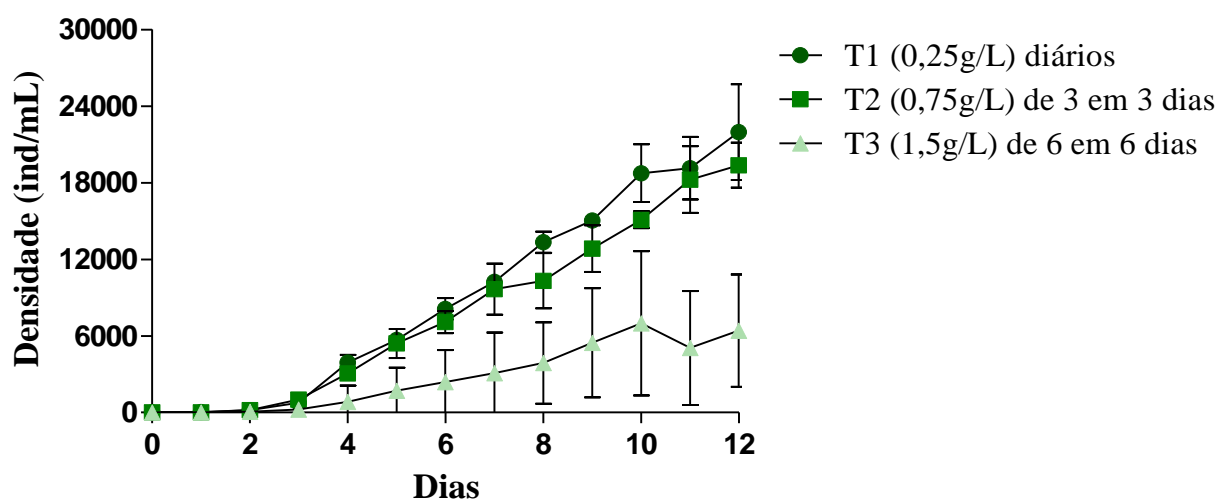


Figura 4.5 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (12 dias), alimentados com levedura (*S. cerevisiae*) nas diferentes frequências de alimentação em estudo. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

Com a análise da figura é possível perceber que a alimentação diária é a que promove uma maior densidade de cultivo,  $21960 \pm 3747$  ind/mL. Contudo, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ) entre fornecer uma alimentação diária ou de 3 em 3 dias, no qual se atingiu um densidade de  $19371 \pm 1764$  ind/mL. Verificaram-se diferenças, a partir do 4º dia, entre os tratamentos T1 e T2 com o tratamento T3 ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Uma alimentação pouco regular, como uma vez por semana por exemplo, provoca uma redução significativa na densidade de *Euplotes* sp. no meio de cultivo, fazendo com que o seu crescimento não atinja as densidades esperadas.

#### 4.5 Quantidade letal de *S. cerevisiae* no meio de cultura

De forma a avaliar se a levedura em excesso poderá ser prejudicial e levar à mortalidade da cultura de ciliados, foram fornecidas quantidades diferentes de alimento, em culturas na sua fase exponencial de crescimento, ou seja, a partir dos 8000 ind/mL. Os resultados estão representados na figura 4.6.

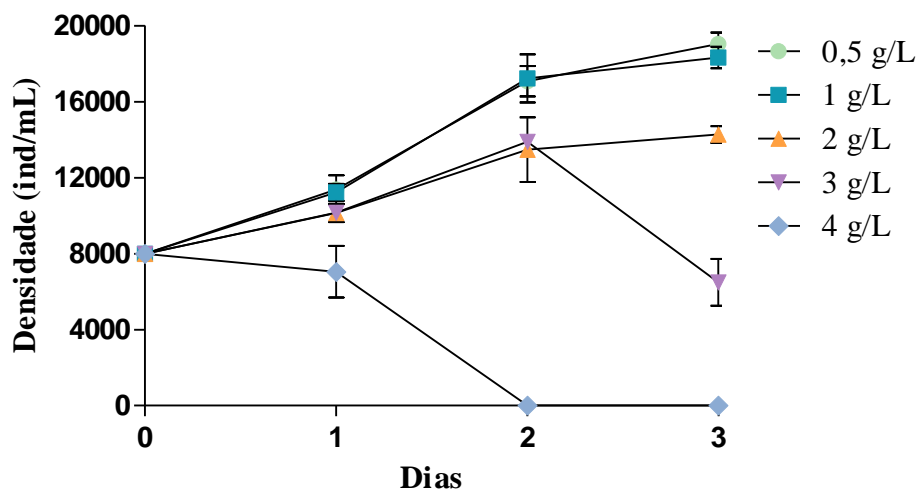


Figura 4.6 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo do tempo (3 dias), alimentados com levedura (*S. cerevisiae*) em diferentes quantidades a partir de uma densidade inicial de cerca de 8000 ind/mL. Os valores correspondem à média  $\pm$ DP (n=4).

Através da observação da figura, é possível perceber que o fornecimento de 4 g/L provoca o declínio da cultura de forma instantânea, sendo apenas necessárias 48 horas para a cultura

passar de cerca de 8000 ind/mL para 0 ind/mL. As culturas alimentadas com 0,5 g/L e 1 g/L são as que apresentam um maior crescimento, não existindo diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ) entre estes dois grupos, não sendo nenhum deles prejudicial ao crescimento de culturas de *Euplotes* sp.. Seguidamente, encontra-se o tratamento em que os ciliados foram alimentados com 2 g/L. No caso do alimento de 3 g/L verifica-se um aumento menos gradual, sendo que ao 3º dia a densidade diminui consideravelmente face ao dia anterior, que é um indicador de que o fornecimento de 3 g/L diárias já é uma quantidade tóxica no meio de cultivo.

A partir do 2º dia já são evidentes as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre os grupos alimentados com 0,5 g/L e 1g/L com o grupo alimentado com 2g/L e 3g/L e ambos têm diferenças com o tratamento alimentado com 4g/L. Ao 3º dia há um decréscimo estatisticamente significativo no tratamento alimentado com 3g/L, sendo mais evidentes as diferenças de 0,5g/L e 1g/L com os restantes tratamentos.

#### 4.6 Efeito do fotoperíodo na densidade de *Euplotes* sp.

Com o intuito de avaliar a influência dos diferentes fotoperíodos na densidade de *Euplotes* sp. foram testadas 3 condições diferentes: T1) 24 horas luz, T2) 12 horas luz 12 horas escuro e T3) 24 horas escuro. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.7.

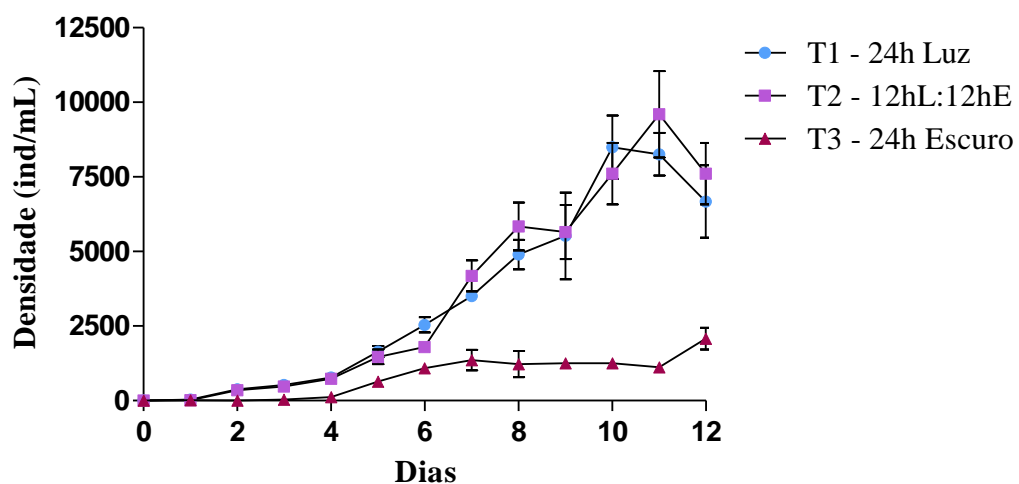


Figura 4.7 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes fotoperíodos. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

Com a análise da figura, verifica-se que existem diferenças no decorrer de todo o ensaio entre os tratamentos 24h Luz e 12hL:12hE quando comparados com o 24h Escuro, pois este é significativamente menor ao longo do tempo (p-value <0,05). A densidade máxima,  $9596 \pm 1450$  ind/mL, foi atingida ao 11º dia no tratamento 12hL:12hE. Na condição 24h luz atingiu-se um máximo de  $8493 \pm 1059$  ind/mL, ao 10º dia, e na condição 24h escuro o valor máximo de densidade alcançado foi de  $2078 \pm 363$  ind/mL, ao 12º dia.

#### 4.7 Efeito da salinidade na densidade de *Euplotes* sp.

De forma a avaliar a influência da salinidade no crescimento da cultura de *Euplotes* sp. foram testadas 4 salinidades (20, 25, 30 e 35), estando os resultados representados na figura 4.8.

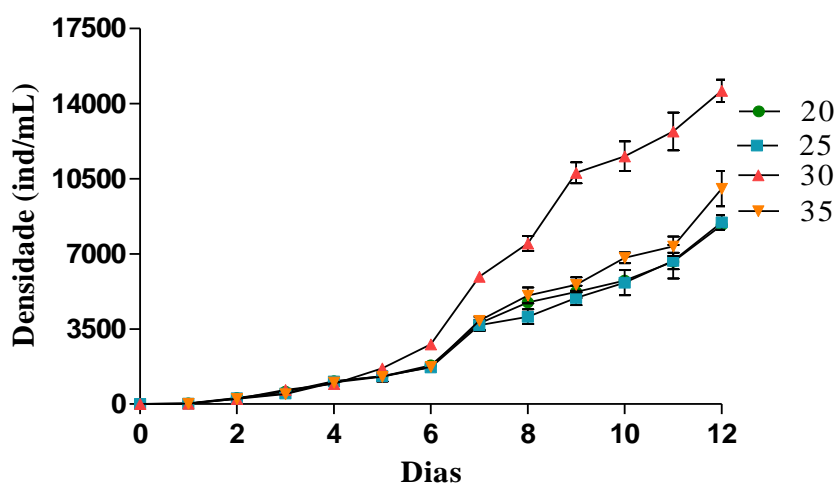


Figura 4.8 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes salinidades. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

Como se pode verificar, a partir do 6º dia de cultivo, evidencia-se um maior crescimento das culturas mantidas a uma salinidade de 30, havendo diferenças estatisticamente significativas comparativamente com a densidade dos restantes cultivos mantidos à salinidade de 20, 25 e 35 (p-value <0,05). No final do ensaio, à salinidade de 30, obteve-se uma densidade de  $14600 \pm 522$  ind/mL,  $10045 \pm 825$  ind/mL à salinidade de 35, enquanto nas salinidades de 20

e 25 a densidade máxima atingida foi de  $8341 \pm 159$  ind/mL e  $8458 \pm 346$  ind/mL, respectivamente

#### 4.8 Efeito da temperatura na densidade de *Euplotes* sp.

A influência das temperaturas (20°, 23°, 25° e 28° C) na densidade de *Euplotes* sp. está representada na figura 4.9.

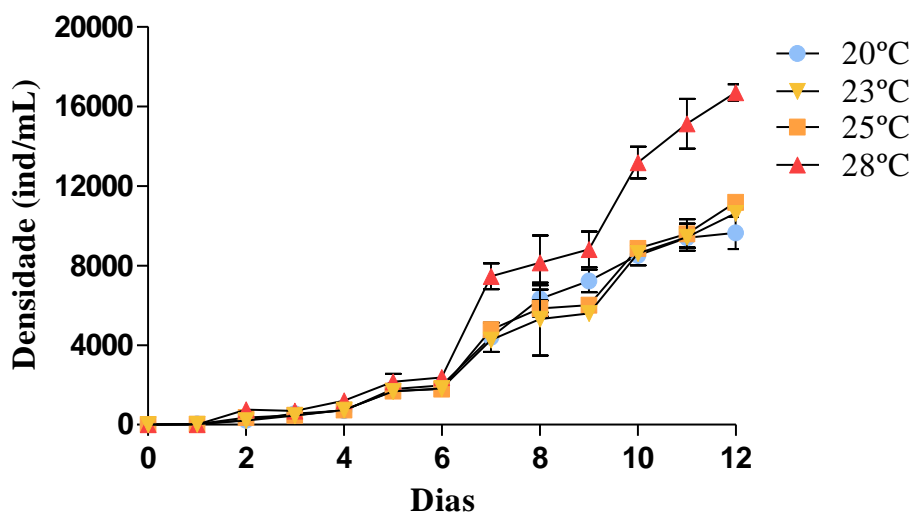


Figura 4.9 - Densidade de ciliados (ind/mL) ao longo de 12 dias sob a influência de diferentes temperaturas. Os valores correspondem à média±DP (n=4).

Verifica-se que ao longo dos ensaios em que as culturas de ciliados foram sujeitas a diferentes temperaturas, houve diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05) entre o tratamento de 28°C com os restantes, a partir do dia 9. Esta temperatura promove um crescimento superior, atingindo um valor máximo de  $16696 \pm 807$  ind/mL, enquanto que as restantes temperaturas ficam próximas dos 10000 ind/mL (20°C-  $9634 \pm 1620$  ind/mL; 23°C-  $10625 \pm 258$  ind/mL; 25°C-  $11175 \pm 668$  ind/mL).



## 5. Discussão

A alimentação de larvas de peixes ornamentais com ciliados está a dar os primeiros passos e como tal é extremamente necessário compreender-se melhor o crescimento de ciliados (*Euplotes* sp.) em condições controladas de forma a conseguir reproduzi-los massivamente, com as condições mais adequadas ao seu desenvolvimento (Moorhead e Zeng, 2010). Os ciliados são protozoários que ocorrem comumente como contaminação em culturas de rotíferos, tal como Reguera (1984) relatou, a rápida propagação de *Euplotes* sp. nas culturas de *B.plicatilis* reduz consideravelmente o seu crescimento, sendo por isso evitados de forma a que não ocorra competição direta pelos recursos disponíveis no meio. Isto porque, tal como Hagiwara *et al.*, (1995) concluíram os rotíferos não afetam o crescimento de *Euplotes* sp. mas a população de ciliados existente pode interferir com o crescimento de *B.plicatilis*. Como tal, estudaram-se vários parâmetros básicos de forma a otimizar o seu crescimento e, como são uma contaminação das culturas de rotíferos, para se encontrar os seus parâmetros ótimos utilizaram-se os parâmetros mais comuns para o cultivo de rotíferos. Todos os parâmetros são muito importantes na otimização da produção de alimento vivo para uso em aquacultura, no entanto um alimento eficiente e de baixo custo é sem dúvida um dos principais desafios.

Neste sentido, este trabalho iniciou-se com a determinação do alimento mais eficaz para o crescimento de culturas de ciliados. Sendo a bibliografia muito reduzida em relação à produção de ciliados, teve-se como base os alimentos utilizados tradicionalmente no cultivo de rotíferos (levedura, microalga e Selco) e o estudo de Côrtes e Tsuzuki (2012) que é, até à data, o único trabalho que estudou o crescimento em massa de *Euplotes* sp., para uso em aquacultura. A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foi o alimento que obteve maiores densidades de indivíduos em comparação com o SELCO 3000 ou a microalga (*Nannochloropsis oculata*). Estes resultados estão de acordo com Côrtes e Tsuzuki (2012), que concluíram que o uso de levedura é o melhor alimento para fazer crescer culturas de ciliados do género *Euplotes*. Também Pandey e Yeragib (2004), que estudaram o crescimento de ciliados *Fabrea salina*, concluíram que o uso de levedura permite a obtenção de um maior crescimento desta espécie de ciliados em comparação com o uso da microalga *Dunaliella* sp. Segundo Cheng *et al.*, (2004) e Dutz e Peters (2008), os ciliados são encontrados em culturas de rotíferos e copépodes competindo com estes pelo alimento

---

(microalga) e causando quebras na produção destes organismos, devido a uma diminuição do alimento disponível. Neste estudo, verificamos que os ciliados têm a capacidade de se alimentar de microalga, levando a uma redução do alimento no meio de cultivo, no entanto a taxa de crescimento dos ciliados foi reduzida. Como referido anteriormente, Côrtes e Tsuzuki (2012) obtiveram resultados similares e justificaram este acontecimento com a possibilidade de a quantidade de microalga fornecida ser insuficiente para que os ciliados tivessem capacidade para se reproduzirem ou então que os ciliados embora se alimentem da microalga, não tenham capacidade para a digerirem e adquirirem energia para o processo reprodutivo. Neste estudo, efetuou-se a monitorização diária da quantidade de microalga disponível para os ciliados, tendo-se verificado que embora houvesse alterações de dia para dia na concentração de *N. oculata*, havia sempre microalga no meio de cultivo em grande quantidade. Neste sentido concluímos que caso se tratasse de falta de alimento, este estaria todos os dias em défice tendo de ser repostos, uma vez que esta situação não se verificou, a falta de crescimento da população de ciliados alimentada, neste estudo, com *N. oculata* não parece estar relacionada com a falta de alimento. Outra das causas poderia ser o tamanho do alimento pois *N. oculata* tem cerca de 2-4  $\mu\text{m}$  (Kagan e Matulka, 2015) e embora Wilks e Sleight (1998) tenham demonstrado que o tamanho do alimento é importante para o desenvolvimento dos ciliados, demonstraram também, que os ciliados se alimentam de partículas desde 0,57 até 10  $\mu\text{m}$ , com preferência para partículas entre os 1,90 até 3,06  $\mu\text{m}$ . Foi com a levedura *S. cerevisiae*, que tem um diâmetro entre os 5-7  $\mu\text{m}$  (Lavens e Sorgeloos, 1996) que se obtiveram as taxas de crescimento mais elevadas demonstrando assim a capacidade que os ciliados têm para se alimentarem de presas/partículas de elevado tamanho, capacidade esta comprovada também pelo estudo de Drillet e Dutz (2014) que demonstraram a capacidade dos ciliados se alimentarem de *Rhodomonas salina*, espécie de microalga de “elevado tamanho”, aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  (Lavens e Sorgeloos, 1996).

A levedura foi melhor aceite pelos ciliados quando comparada com SELCO 3000, apesar de este ter mais interesse quando o objetivo é usar os ciliados para alimentar larvas de peixes, pois a sua constituição já é enriquecida com ácidos gordos poli-insaturados. A levedura é um alimento com um valor nutricional mais baixo, mas os ciliados, uma vez que são filtradores não seletivos, podem ser enriquecidos de forma a adquirirem os ácidos gordos poli-insaturados necessários às larvas antes de serem administrados como alimento vivo. Sabe-se que os ciliados são capazes de incorporar níveis moderados de ácidos gordos

---

(especialmente n - 3 EPA e DHA) mas mesmo assim, a sua capacidade de incorporação é menor do que a dos rotíferos ou artémia (Côrtes e Tsuzuki, 2012).

O cultivo alimentado com levedura, apesar de ser o que obtém crescimentos superiores, é o que degrada mais a qualidade da água uma vez que é o único onde são registados valores de amónia e nitritos. No entanto, este parece não ser um problema para a produção de *Euplotes* sp., uma vez que os ciliados suportam facilmente concentrações muito mais elevadas de amónia que a maior parte dos organismos como, por exemplo, rotíferos (Cheng *et al.*, 2004). Por isso, muitas vezes os ciliados acabam por sobreviver nas águas das culturas dos rotíferos mesmo após estes morrerem. Os valores de amónia registados, próximos de 8 mg/L, encontram-se dentro do esperado para 15 dias de ensaio, uma vez que Côrtes e Tsuzuki (2012) ao fim de 6 dias a alimentar ciliados com levedura obtiveram concentrações totais de amónia próximas de 4 mg/L. Por isso, pode afirmar-se que os valores de amónia obtidos não influenciam negativamente o crescimento de *Euplotes* sp.. Tal como Xu *et al.*, 2004 concluíram a concentração limite de amónia para causar inibição de crescimento em *E. vannus* é cerca de 100 mg/L.

Durante muito tempo os ciliados foram considerados prejudiciais para os restantes cultivos, mas recentemente, foi demonstrado que desempenham um papel positivo na melhoria e manutenção da qualidade da água em ambientes aquáticos com altos níveis de amónia (Xu *et al.*, 2004). Tal como acontece com a amónia, só foram registados nitritos no tratamento alimentado com levedura. Os nitritos registados são valores substanciais, 0,5 mg/L, o que é considerado um valor normal. Na verdade, estes organismos têm uma capacidade extraordinária para tolerar compostos azotados, sendo muito mais resistentes do que qualquer outra presa viva tradicionalmente utilizada em aquacultura (Côrtes e Tsuzuki, 2012).

Em suma, apesar de a cultura alimentada com levedura ser a única onde se registaram alterações na qualidade de água, este foi o alimento que promoveu um maior crescimento da cultura de *Euplotes* sp..

Após a determinação do melhor alimento para produzir *Euplotes* sp., a determinação da quantidade e do método de administração do alimento é fundamental para a otimização do cultivo.

---

O crescimento de *Euplotes* sp. demonstrou ser influenciado pela disponibilidade de alimento no meio, uma vez que, nos ensaios onde a administração de alimento foi baseada na densidade de ciliados, a diminuição da quantidade de alimento, levou a uma menor taxa de crescimento da população. Se por alguma razão externa, a densidade de ciliados diminuísse, a quantidade de alimento que se iria fornecer também seria menor, o que provocaria um decréscimo da população, porque o alimento disponível era menor. Ou seja, se a densidade de indivíduos for menor, fornece-se menos alimento, uma vez que têm menos alimento disponível também não terão capacidade para crescer mais. No entanto e embora a quantidade mais elevada de alimento administrada (0,5g/milhão de ciliados) fosse a que até ao 9º dia proporcionou uma maior densidade de ciliados, a partir desse dia, a população colapsou repentinamente após atingir cerca de 8000 ind/mL, resultados contraditórios aos obtidos por Côrtes *et al.*, (2013) que conseguiram cerca de 15000 ind/mL, alimentando-os da mesma forma.

Embora no trabalho realizado por Côrtes *et al.*, (2013), com a mesma metodologia de alimentação, não se tenha verificado colapso da cultura após serem atingidas as densidades próximas de 8000 ind/mL, neste estudo, isso verificou-se sempre que a quantidade de alimento administrada, com base na densidade, se aproximou de 4g/L de levedura. O ensaio posteriormente realizado sobre a quantidade letal de alimento, veio confirmar que o fornecimento superior a 3 g/L de levedura, de forma diária, leva à mortalidade da cultura.

A levedura começou por ser administrada conforme o protocolo descrito por Côrtes *et al.*, (2013) no entanto, para além dos já referidos efeitos adversos do excesso de alimento baseado neste método de alimentação, o fornecimento de uma quantidade de alimento baseada na densidade do cultivo exige a monitorização diária para correta administração do alimento. Neste sentido, procurou-se encontrar outras formas de alimentação, nomeadamente através do fornecimento de uma quantidade fixa de alimento ao longo do tempo de cultivo. Verificou-se que este é um método mais eficaz comparativamente à alimentação com base na densidade (g/milhão de indivíduos), e que fornecer 0,5g/L ou 0,25g/L diariamente não influencia o crescimento de *Euplotes* sp., pois em ambos os casos, são atingidas densidades próximas dos 20000 ind/mL. Por isso, e tendo sempre em mente o objetivo de otimizar o cultivo de forma a diminuir os custos associados, o fornecimento de 0,25g/L adequa-se melhor pois promove um crescimento ótimo com uma menor quantidade de alimento fornecida.

---

Quando o alimento é fornecido numa quantidade constante, sabe-se que, numa fase inicial, o alimento disponível é muito superior ao alimento que realmente é consumido pelos ciliados, mas assim que a cultura atinge uma densidade mais elevada, o alimento fornecido é exatamente o mesmo e o número de ciliados continua a aumentar. O que sugere que a levedura que é dada em excesso (na fase inicial do ensaio) tem a capacidade de se manter disponível no meio de cultivo para ser consumida mais tarde (numa fase mais final em que os ciliados se encontram em densidades elevadas). Mesmo assim, quando é atingida uma fase em que a densidade é muito elevada (próxima dos 22000 ind./mL, por exemplo) toda a levedura restante no meio já foi consumida e a que é fornecida continua a ser insuficiente para que a cultura tenha capacidade de se alimentar para se manter em crescimento. Pensa-se que devido à degradação do meio, através da acumulação de compostos orgânicos e pela quantidade insuficiente de alimento, o cultivo começa a decrescer. Ao fazer uma comparação em termos de eficiência de cultivo, tendo em atenção os gastos associados, é muito mais vantajoso um cultivo em que o fornecimento de alimento seja constante. Isto porque, desta forma, consegue-se atingir densidades mais elevada de ciliados, com um fornecimento menor de alimento, logo com um gasto menor associado. Isto facilmente se percebe quando se compara o crescimento dos ciliados com a quantidade de alimento fornecida. Por exemplo, o tratamento T1 do ensaio da quantidade, ao 11º dia tem uma densidade de 22000 ind/mL e o total de alimento fornecido até aí foi de 5,5g de levedura, enquanto que no tratamento T2 do ensaio da qualidade e frequência de alimentação, atingiu-se uma densidade máxima de 8000 ind/mL com um dispêndio total de alimentação próximo das 10g. Sendo praticamente o dobro de alimento gasto o que não promove nem metade do crescimento na cultura de ciliados.

Uma vez que não se verificaram diferenças de densidade no fornecimento de alimento diário ou de 3 em 3 dias e que, em ambas as situações, se atingiram densidades próximas dos 20000 ind/mL (21900 ind/mL no tratamento com alimentação diária e 19300 ind/mL no tratamento alimentado de 3 em 3 dias), em termos de mão-de-obra torna-se mais vantajoso realizar o procedimento de 3 em 3 dias em vez de diariamente, uma vez que não há qualquer influência negativa no crescimento populacional.

Como já abordado anteriormente, ao longo dos vários ensaios percebeu-se que quando a concentração de alimento no meio era muito elevada, a população de *Euplotes* sp. entrava

---

em colapso. Não se tendo chegado a uma conclusão efetiva do que promove esta situação, ainda assim uma das causas possíveis tem a ver com a degradação da qualidade da água. Como tal achou-se essencial perceber a quantidade de alimento, em g/L, que se pode fornecer sem que haja quebras na densidade de indivíduos. Percebeu-se que, quando a cultura se encontra a uma densidade moderada (próxima dos 8000 ind/mL), a partir das 3g/L diárias torna-se letal. Provavelmente o excesso de alimento está a ser desaproveitado, e deste modo, torna-se prejudicial, uma vez que degrada a qualidade da água e diminui o oxigénio dissolvido tornando o meio inadequado para o crescimento de *Euplotes* sp., acabando por colapsar o cultivo.

Contrariamente ao sucedido no estudo de De Winter e Persoone (1975) com *F.salina*, onde não foram observadas diferenças na sua densidade populacional quando o cultivo foi feito sob condições de iluminação contínua (24h luz) e completa escuridão (24h escuro). Neste estudo foram obtidas diferenças na produção realizada com as diferentes condições de luz. Sabe-se que os ciliados são organismos heterotróficos, por isso, a luz não tem influência direta nos seus processos metabólicos internos, no entanto, a iluminação poderá favorecer a atividade dos ciliados, aumentando a sua capacidade de filtração levando a uma maior capacidade de divisão celular, assim neste sentido, sugere-se que o cultivo seja feito num ambiente com exposição à luz. Em termos energéticos e no que visa à rentabilidade e otimização do processo, a utilização de fotoperíodo 12hLuz:12hEscuro é a mais aconselhada, uma vez que não existem diferenças entre submeter os cultivos a 24h de luz ou a 12hLuz:12hEscuro.

A salinidade é um dos fatores ambientais que mais influencia a densidade de ciliados no ambiente natural (Zhang *et al.*, 2015). No entanto, e tal como demonstrado por Santhakumari (1985), que estudou o efeito da salinidade em cinco espécies de ciliados, cada espécie poderá responder de forma diferente à variação da salinidade. De uma forma geral, sabe-se que os ciliados têm no ambiente natural uma maior capacidade para tolerar salinidades mais baixas do que mais altas. No entanto, quando falamos do ambiente natural temos de considerar que a variação de salinidade poderá significar alterações de muitos outros fatores, como oxigénio, disponibilidade de alimento, etc, que de forma indireta podem afetar a população de ciliados. Neste trabalho, foi possível variar apenas a salinidade, mantendo os restantes parâmetros de cultivo estáveis, tendo-se observado um maior crescimento dos ciliados mantidos a uma salinidade de 30. O estudo realizado por Crosbie e Munday (1999),

demonstrou o favorecimento da utilização de uma salinidade de 35, comparativamente com 15 e 25 no cultivo do ciliado *Uronema nigricans*.

Em relação à temperatura, sabe-se que esta tem uma grande influência sobre a vida microbiana e até um certo nível, o aumento da temperatura acelera o seu crescimento e reprodução (Pandey e Yeragib, 2004). No presente estudo, verificou-se que *Euplotes* sp. apresenta um crescimento ótimo a temperaturas mais elevadas, neste caso 28°C. Possivelmente este maior crescimento a temperaturas mais elevadas está relacionado com o aumento do metabolismo, levando a que o organismo se reproduza a uma maior velocidade. Este resultado encontra-se de acordo com o documentado por Rattan *et al.*, (1999) que afirmam que a temperaturas mais baixas, o crescimento da população de *F. salina* é menor que em temperaturas mais altas, onde havia um súbito aumento da densidade populacional. Entre todas as restantes temperaturas o crescimento é bastante semelhante uma vez que não se verificam diferenças entre fazer o cultivo a 20°C, 23°C ou 25°C. Pandey e Yeragib (2004), sugerem que de acordo com o seu trabalho realizado com os ciliados *F. salina* no qual utilizaram temperaturas variáveis entre os 24°C e 36°C, o melhor é utilizar uma temperatura próxima dos 28°C para a produção em massa de ciliados de forma a evitar o colapso rápido da população devido a atingirem muito rapidamente a fase de crescimento exponencial. A temperaturas mais baixas, próximas dos 18°C, sabe-se que a população de ciliados sobrevive, mas não se conseguem reproduzir (De Winter e Persoone, 1975). Pensa-se que seja devido ao facto de a temperatura influenciar o metabolismo e afetar a taxa de ingestão podendo alterar a sua capacidade natatória (Marangoni *et al.*, 2006).



## 6. Conclusão e Perspetivas futuras

À semelhança de outros organismos, com potencial para alimentação de larvas marinhas, o cultivo de *Euplotes* sp. tem algumas vantagens e desvantagens. A sua reduzida dimensão corporal é extremamente vantajosa para larvas com tamanho de boca mais pequeno, como algumas larvas de peixes ornamentais. O rápido crescimento em condições favoráveis, nas quais se atingem elevadas densidades (superiores a 20000 ind./mL) e a sua elevada resistência a fatores externos, tais como a qualidade da água são outras vantagens. Sabe-se que suportam elevadas concentrações de amónia, nas quais outros organismos não sobreviveriam (Xu *et al.*, 2004).

As possíveis desvantagens baseiam-se no facto de estes protozoários precisarem de ser enriquecidos antes de serem fornecidos, como presas às larvas de peixes, tal como acontece com outros alimentos vivos como, por exemplo *Artemia* sp. e *Branchionus* sp. Por outro lado, estes organismos têm hábitos bentónicos, fazendo com que não se distribuam de uma forma homogénea na água dos cultivos larvares, podendo dificultar o contacto presa-predador essencial durante a fase larvar (Cheng *et al.*, 2004).

Até à data a informação sobre o cultivo de *Euplotes* sp. é muito reduzida e os dados obtidos neste estudo vêm aumentar o conhecimento sobre as condições de cultivo destes ciliados e desta forma possibilitar o desenvolvimento de protocolos para a sua produção em massa de ciliados *Euplotes* sp. Como tal, as condições de cultivo ótimas para a produção de ciliados *Euplotes* sp. são uma alimentação de 0,25 g/L de levedura *S.cerevisiae*, de 3 em 3 dias em que as culturas são mantidas com arejamento constante, a um fotoperíodo de 12hLuz:12hEscuro, à temperatura de 28°C e à salinidade de 30.

No presente estudo foi possível aumentar o conhecimento sobre as condições de cultivo de ciliados *Euplotes* sp. com vista a utilizar estes organismos como alimento vivo nas primeiras fases larvares de espécies de peixes marinhos ornamentais. Embora este trabalho tenha contribuído significativamente para este conhecimento, mais estudos deverão ser conduzidos no futuro, de forma a responder a outras questões que não foram possíveis responder neste trabalho.

Como perspetivas futuras para o presente trabalho, destaca-se o estudo do comportamento do crescimento da população em cultivos em volumes de maiores dimensões e o estudo do cultivo de *Euplotes* sp. em regime contínuo. Outro ponto importante a desenvolver no futuro

será a identificação da espécie de *Euplotes sp.* em causa e estudar o seu perfil nutricional e as condições de otimização de bioencapsulação.

Finalmente poder-se-ão iniciar estudos de desenvolvimento larvar de espécies ornamentais marinhas, utilizando como primeiro alimento ciliados do género *Euplotes*.

---

## 7. Referências Bibliográficas:

- Barber C., Pratt V., 1998. Poison and profits: cyanide fishing in the Indo-Pacific. *Environment* 40: 28–34.
- Cheng H., Aoki S., Maeda M., Hino A., 2004. Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* fed on two different algae. *Aquaculture* 241:331-343.
- Chen X., Honggang M., Khaled A., 2014. Taxonomic description of a new marine ciliate, *Euplotes qingdaoensis* n. sp. (Ciliophora: Euplotida). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 32(2): 426-432.
- Coker D., Wilson S., Pratchett M., 2014. Importance of live coral habitat for reef fishes. *Reviews In Fish Biology And Fisheries* 24(1): 89-126.
- Côrtes G., 2009. Produção e utilização de diferentes fontes de alimento vivo na fase inicial de larvicultura do néon gobi (*Elacatinus figaro*). Dissertação de mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Pós-Graduação em Aquicultura. Pp. 1-53.
- Côrtes G., Tsuzuki M., 2010. Effect of rotifer size on survival and growth of the barber goby *Elacatinus figaro* during the initial phases of development. *Boletim do Instituto Pesca* 36(3): 205 – 212.
- Côrtes G., Tsuzuki M., 2012. Effect of different live food on survival and growth of first feeding barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997) larvae. *Aquaculture Research* 43: 831–834.
- Côrtes G., Tsuzuki M., Melo E., 2013. Monoculture of the ciliate protozoan *Euplotes* sp. (Ciliophora; Hypotrichia) fed with different diets. *Biological Sciences* 35(1): 15-19.
- Crosbie P., Munday B., 1999. Environmental factors and chemical agents affecting the growth of the pathogenic marine ciliate *Uronema nigricans*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 213-219.
- Cunha R., 2006. Propagation and Nutrition of the Soft Coral *Sinularia* sp., *Science in Shellfish Biology, Fisheries and Culture*. University of Wales, Wales, 65.
- De Winter F., Persoone G., 1975. Preliminary culture experiments with the ciliate *Fabrea salina* as a potential live food for mariculture purposes. In: Persoone, G., Jaspers, E. (Eds.), *Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology*, vol. 1. Mariculture Universal Press, Wetteren, Belgium.
- Dee, L., Horii, S., Thornhill, D., 2014. Conservation and management of ornamental coral reef wildlife: Successes, shortcomings, and future directions. *Biological Conservation* 169: 225-237.
- Dhar, B., Ghosh, S., 2015. Genetic assessment of ornamental fish species from North East India. *Gene* 555: 382-392.
- Drillet G., Dutz J., 2014. Dealing with the presence of the ciliate *Euplotes* sp. in cultures of the copepod *Acartia tonsa*. *Aquaculture International* 22: 391-398.

- 
- Dutz J., Peters J., 2008. Importance and nutritional value of large ciliates for the reproduction of *Acartia clausi* during the post spring-bloom period in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 50: 261-277.
- Fujita S., Watanabe T., Kitajima C., 1980. Nutritional quality of *Artemia* from different localities as a living feed for marine fish from the view point of essential fatty acid. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia, Culturing and Use in Aquaculture*. Universa Press, Western, Belgium, pp. 277–290, Ecology 3.
- Games P., Howell J., 1976. Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. *Journal of Educational Statistics* 1:113-125
- Green E., 2003. International trade in marine aquarium species: using the global marine aquarium database. In: Cato, J., Brown, C. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, pp. 31–47.
- Hagiwara A., Jung M., Sato T., Hirayama K., 1995. Interspecific Relations between Marine Rotifer *Brachionus rotundiformis* and Zooplankton Species Contaminating in the Rotifer Mass Culture Tank. *Fisheries Science* 61: 623-627.
- Holt J., Holt S., 2000. A vertical distribution and role of physical processes in the feeding dynamics of two larval sciaenids *S. Ocellatus* and *C. nebulosus*. *Marine Ecology Progress Series* 193: 181-190.
- Hunt Von Herbing I., Gallager M., 2000. Foraging behaviour in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod Nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). *Marine Biology* 136: 591-602.
- Jung M., 2012. Biological Application of Two Protozoan Species, *Euplotes* sp. and *Vorticella* sp., for the Stable Culture of the Rotifer *Brachionus rotundiformis* in Laboratory Experiments of Inter- and Tripartite-Specific Relations. *Fish Aquatic Sciences* 15(3): 209-213.
- Kagan M., Matulka R., 2015. Safety assessment of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Toxicology Reports* 2: 617-623.
- Kirk R., 1982. *Experimental design: procedures for the behavioral sciences*. Brooks/Cole Pub. Co., Monterey, Calif
- Kumar T., Gunasundari V., Prakash S., 2015. Breeding and Rearing of Marine Ornamentals. In: *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, eds. Perumal, S., Thirunavukkarasu, A., Pachiappan, P., pp. 101-107. Springer India.
- Laurel B., Brown J., Anderson A., 2001. Behaviour, growth and survival of redbfish larvae in relation to prey availability. *Journal of Fish Biology* 59: 884-901
- Lavens P., Sorgeloos P., 1996. *Manual on the Production and use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, Italy, 295pp.

- 
- Leal M., Vaz M., Puga J., Rocha R., Brown C., Rosa R., Calado R., 2016. Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. *Fish and Fisheries* 17: 459–468.
- Madhu K., Madhu R., Rethesh T., 2016. Spawning, embryonic development and larval culture of redhead dottyback *Pseudochromis dilectus* (Lubbock, 1976) under captivity. *Aquaculture* 459: 73–83.
- Maeda M., Hino A., 1991. Environmental management for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: Fulks, W., Main, K. (Eds.), *Rotifer and microalgae culture systems*, Proceedings of US–Asia Workshop.
- Marangoni R., Marroni F., Ghetti F., Gioffré D., Colomebtti G., 2006. Effect of UV-B Radiation on Ciliated Protozoa. *Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models*. F. Ghetti, G. Checcucci and J. F. Bornman, Springer Netherlands. 57: 231-248.
- Moorhead J., 2014. Research-scale tank designs for the larval culture of marine ornamental species, with emphasis on fish. *Aquacultural Engineering* 64: 32-41.
- Moorhead J., Zeng, C., 2010. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: A review. *Reviews in Fisheries Science* 18(4): 315-343.
- Nagano N., Iwatsuki Y., Kamiyama T., Shimizu H., Nakata H., 2000a. Ciliated protozoans as a food first-feeding larval grouper, *Epinephelus septemfasciatus*: Laboratory experiment. *Plankton Biology and Ecology* 47: 93-99.
- Nagano N., Iwatsuki Y., Kamiyama T., Nakata H., 2000b. Effects of marine ciliates on survivability of the first-feeding larval surgeonfish, *Paracanthurus hepatus*: Laboratory rearing experiments. *Hydrobiologia* 432: 149-157.
- Navarro J., Henderson R., McEvoy L., Bell M., Amat F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155-166.
- Olivotto I., Zenobi A., Rollo A., Migliarini B., Avella M., Carnevali O., 2005. Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture*: 250: 175-182.
- Olivotto I., Planas M., Simões N., Holt G., Calado R., 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal World Aquaculture Society* 42:135–166.
- Olivotto I., Chemello G., Vargas A., Randazzo B., Piccinetti C., Carnevali O., 2016. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory” General and Comparative Endocrinology. (*in press*).
- Pandey B., Yeragib S., 2004. Preliminary and mass culture experiments on a heterotrichous ciliate, *Fabrea salina*. *Aquaculture* 232: 241–254.

- 
- Pena R., Dumas A., Trasvina G., Pliego-Cortez H., 2005. Effects of tank colour and prey density on first feeding of the spotted sand bass *Parabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research* 36: 1239-1242.
- Pierce R., Turner J., 1992. Ecology of planktonic ciliates in marine food webs. *Reviews in Aquatic Sciences* 6:139-181.
- Pomeroy S., Parks E., Balboa M., 2006. Farming the reef: is aquaculture a solution for reducing fishing pressure on coral reefs? *Marine Policy* 30:111-130.
- Rattan P., Ansari Z.A., Chatterji A., 1999. Studies on experimental culture of a marine ciliate *Fabrea salina*. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 14(4): 299– 308.
- Reguera B. 1984. Effect of ciliate contamination in mass cultures of the rotifer, *Brachionus plicatilis* O.F. Muller. *Aquaculture* 40(2): 103-108.
- Roiha I., Otterlei E., Samuelsen O., 2011. Evaluating bioencapsulation of florfenicol in rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture Research* 42(8): 1110-1116.
- Rønnestad I., Kamisaka L., Conceição L., Morais S., Tonheim S., 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity of proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture* 268:82-97.
- Sadovy J., Vincent J., 2002. Ecological issues and the trades in live reef fishes. Pages: 391–420 in P. F. Sale, editor. *Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Santhakumari V., 1985. The effect of salinity on some endocommensal ciliates from shipworms. *Fishery technology* 22: 66-69.
- Saravanan R., Vijayanand P., Vagelli A., Murugan A., Shanker S., Rajagopal S., Balasubramanian T., 2013. Breeding and rearing of the two striped cardinalfish, *Apogon quadrifasciatus* (Cuvier, 1828) in captive condition. *Animal Reproduction Science* 137: 237– 244.
- Sazima I., Moura R., Rosa R., 1997. *Elacatinus figaro* (Perciformes: Gobiidae), a new cleaner goby from the coast of Brazil. *Aqua: Journal of Ichthyology and Aquatic Biology* 2(3): 33–38.
- Shei, M., Rodrigues, R., Sampaio, L., 2012. Use of commercial live feeds enrichment during first period of the barber goby *Elacatinus figaro*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* 5(1): 9-12.
- Støttrup J., Mcevoy I., 2003 *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Thruston M., 2002. The benefits and risks of aquaculture production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205: 203–219.

Vagelli A., 2004. Significance increase in survival of captive-bred juvenile Banggai cardinalfish *Pterapogon kauderni*, with an essential fatty acid enriched diet. *Aquaculture* 35(1): 61–69.

Van N., Hoa N., Bossier P., Sorgeloos P., Stappen G., 2014. Mass selection for small-sized cysts in *Artemia franciscana* produced in Vinh Chau salt ponds, Vietnam. *Aquaculture Research* 45(10): 1591-1599.

Wabnitz C., Taylor M., Green E., Razak T., 2003. From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species. UNEP: Cambridge. 1-64 p.

Wilks S., Sleigh M., 1998. Grazing rates in *Euplotes mutabilis*: Relationship between particle size and concentration. *Microbial Ecology* 36(2): 165-174

Xu H., Song W., Warren A., 2004. An investigation of the tolerance to ammonia of the marine ciliate *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). *Hydrobiologia* 519(1): 189-195.

Zhang C., Zhang W., Ni, X, Zhao Y., Huang L., Xiao T., 2015. Influence of different water masses on planktonic ciliate distribution on the East China Sea-shelf. *Journal of Marine Systems* 141: 98-111.

Zar J., 2009. "Biostatistical analysis," Upper Saddle River, NJ : Pearson Education International.