



*Manutenção de espécies ornamentais marinhas e otimização das suas formas de cultivo*

**João André Cunha Lopes**

2018





*Manutenção de espécies ornamentais marinhas e otimização das suas formas de cultivo*

**João André Cunha Lopes**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Relatório de estágio realizado sob a orientação do Doutor Paulo Maranhão

2018



Título: Manutenção de espécies ornamentais marinhas e otimização das suas formas de cultivo

Copyright © João André Cunha Lopes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

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**

Quero agradecer em primeiro lugar à minha família por me apoiarem em todas as fases da minha vida e por me fazerem acreditar que consigo atingir os meus objetivos.

Ao Doutor Paulo Maranhão por me acompanhar e orientar desde o início do percurso, tendo sido uma ajuda fundamental na realização deste trabalho.

À AQUASPROSEA pela oportunidade de estagiar e aprender mais sobre esta área.

Um obrigado ao João Chambel e à Catarina Mendes por me terem recebido durante o estágio e pelo apoio e aprendizagem que me ofereceram.

Um agradecimento também à Professora Susana Mendes pela ajuda e disponibilidade na correção da tese.

Por fim um grande obrigado a todos os meus amigos pelo apoio que me dão e por me acompanharem em todos os momentos.



## Resumo

A aquacultura ornamental marinha é um recurso sustentável com potencial para combater os problemas existentes nos recifes de coral. Para reduzir as capturas do meio selvagem e continuar a dar resposta ao mercado é necessário aumentar a produção mundial destes organismos. Deste modo é fundamental desenvolver e aprofundar a criação em cativeiro, conhecendo melhor as espécies e os respetivos métodos de produção.

Este trabalho teve como objetivos a realização de um estágio na empresa AQUASPROSEA e ainda o estudo de alguns assuntos relacionados com os métodos de produção nesta área. Durante o estágio foi possível ter um contacto direto com a tecnologia existente até a data, na produção de organismos marinhos ornamentais. Isto incluiu o conhecimento de diversas espécies de peixes, dos seus ciclos de vida e ainda dos protocolos de criação de cada uma delas. A produção destes organismos implica a manutenção de reprodutores, o cultivo larvar, a pré-engorda e por fim a engorda. Paralelamente, também foram executados os procedimentos necessários para o correto funcionamento dos sistemas de suporte de vida e também a produção de alimentos vivos nomeadamente microalga, rotíferos e artémia. Por outro lado, foram testadas três metodologias de produção, mais concretamente os métodos de captura de larvas, a concentração do método da “água verde” e por fim o desmame de peixes juvenis. Os resultados dos métodos de captura demonstraram que a utilização de um tubo com 8 ou 10 mm oferecem vantagens na sobrevivência larvar e facilidade/rapidez de utilização. O camaroeiro também mostrou ser fiável na sobrevivência dos indivíduos. No segundo ensaio, a utilização de maiores concentrações de microalga no método da “água verde” melhoram a sobrevivência e o crescimento larvar de *Amphiprion frenatus*. Para terminar, o desmame de *Amphiprion ocellaris* aos 14 dias após eclosão não provoca maior mortalidade nos indivíduos embora o crescimento seja consideravelmente superior se for fornecido alimento vivo enriquecido.

Todo o trabalho desenvolvido contribuiu para o aumento do conhecimento ao nível pessoal, através do estágio, e também com novas informações para comunidade científica sobre a produção de organismos ornamentais marinhos.

Palavras-chave: Aquacultura ornamental; Captura larvas; Método “água verde”; Desmame; AQUASPROSEA, Lda.



## Abstract

Marine ornamental aquaculture is a sustainable resource with potential to combat problems in coral reefs. To reduce catches in the wild and continue to respond to the market it is necessary to increase the world production of these organisms. In this way it is essential to develop and deepen the breeding in captivity, by increasing our knowledge of such species and their respective methods of production.

This work had as objectives the accomplishment of an internship in the company AQUASPROSEA and also the study of some subjects related to the production methods in this area. During the internship it was possible to have direct contact with current technology in the production of ornamental marine organisms. This included knowing the species of fish, their life cycles and the protocols for reproducing and maintaining each one. Such endeavor involves maintenance of breeding, larval cultivation, pre-fattening and finally fattening stages. Meanwhile, the necessary procedures were also carried out for the correct functioning of life support systems and also the production of live foods, such as microalgae, rotifers and artemia. On the other hand, three production methodologies were tested, namely the methods of capture of larvae, the concentration of the "green water" method and finally the weaning of juvenile fish. The results of the capture methods have demonstrated that the use of a 8 or 10 mm tube offers advantages in larval survival and ease/speed of use. The use of a small net also proved to be reliable in the survival of individuals. In the second trial, the use of higher concentrations of microalgae in the "green water" method improves survival and larval growth of *Amphiprion frenatus*. Finally, weaning of *Amphiprion ocellaris* at 14 days post hatching does not cause increased mortality in the individuals although growth is considerably higher if enriched live feed is provided.

All the work developed contributed to the increase of the knowledge at the personal level, throughout the internship, and also contributed with new information for the scientific community on the production of marine ornamental organisms.

Key-words: Ornamental aquaculture; Capture larvae; "Green water" method; Weaning; AQUASPROSEA, Lda.



# Índice de matérias

1.	Introdução .....	1
2.	Objetivos .....	5
3.	Descrição do estágio .....	7
3.1.	A empresa .....	7
3.2.	Instalações .....	8
3.2.1.	Zona de reprodutores, pré-engorda e cultivo larvar .....	8
3.2.2.	Zona de cultivos auxiliares e embalagem .....	10
3.2.3.	Zona de engorda .....	11
3.2.4.	Zona de quarentena .....	12
3.2.5.	Área de lavagens .....	12
3.2.6.	Zona técnica e de pessoal .....	12
3.3.	Ciclo geral de produção .....	13
3.4.	Espécies Produzidas .....	14
3.4.1.	Peixe-Palhaço .....	14
3.4.2.	Góbios .....	15
3.4.3.	Pseudochromis .....	16
3.5.	Tarefas e rotinas .....	18
3.5.1.	Diárias .....	18
3.5.2.	Semanais .....	21
3.5.3.	Ocasionais .....	22
4.	Ensaio Experimentais .....	23
4.1.	Efeito dos métodos de captura na sobrevivência larvar do peixe-palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i> .....	23
4.1.1.	Introdução .....	23
4.1.2.	Materiais e Métodos .....	25
4.1.3.	Resultados .....	27
4.1.4.	Discussão e Conclusão .....	28
4.2.	Influência da concentração da “água verde” na sobrevivência e crescimento do peixe-palhaço <i>Amphiprion frenatus</i> .....	30
4.2.1.	Introdução .....	30
4.2.2.	Materiais e Métodos .....	32
4.2.3.	Resultados .....	34
4.2.4.	Discussão e Conclusão .....	36
4.3.	Influência do desmame na sobrevivência e crescimento de juvenis do peixe- palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i> .....	39
4.3.1.	Introdução .....	39
4.3.2.	Materiais e Métodos .....	41
4.3.3.	Resultados .....	43
4.3.4.	Discussão e Conclusão .....	45
5.	Conclusão .....	49
6.	Referências Bibliográficas .....	51



## Índice de figuras

Figura 3.1 – Logótipo da empresa.....	7
Figura 3.2 - Planta das instalações da empresa. Legenda: 1 – Zona de reprodutores, pré-engorda e cultivo larvar; 2 – Zona de cultivos auxiliares e embalamento; 3 – Zona de engorda; 4 – Zona de quarentena; 5 – Área de lavagens; 6 – Área de Pessoal.....	8
Figura 3.3 – (A) Sistema de reprodutores; (B) Casal de <i>Amphiprion percula</i> e respetiva postura.....	9
Figura 3.4 – (A) Sistema de cultivo larvar; (B) Sistema de pré-engorda.....	10
Figura 3.5 – Representação dos vários cultivos auxiliares realizados na empresa. (A) Rotíferos; (B) Rotíferos e microalgas; (C) Artémia.....	10
Figura 3.6 - (A) Sistemas de engorda. (B) Sistema de preparação de saída de peixes.....	11
Figura 3.7 - Área de Lavagens.....	12
Figura 3.8 – Esquema do ciclo geral de produção da empresa, neste caso representado pela espécie <i>Amphiprion ocellaris</i> .....	13
Figura 3.9 – Variações de <i>Amphiprion ocellaris</i> : (A) Variação Black Ocellaris; (B) Variação Premium Snowflake.....	14
Figura 3.10 - (A) <i>Elacatinus figaro</i> ; (B) <i>Elacatinus oceanops</i> . Fontes: <a href="http://www.amongthereef.com">www.amongthereef.com</a> ; <a href="http://www.icmbio.gov.br">www.icmbio.gov.br</a> .....	16
Figura 3.11 – (A) <i>Pseudochromis fridmani</i> ; (B) <i>Pseudochromis flavivertex</i> .....	17
Figura 4.1 – (A) Tubos de 8, 10 e 15 mm utilizados para sifonar larvas; (B) Camaroeiro utilizado para recolha das larvas.....	25
Figura 4.2 - Sobrevivência larvar (média±DP) de <i>Amphiprion ocellaris</i> conforme o método de captura. O símbolo * identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ).....	27
Figura 4.3 – Aquários de cultivo larvar utilizados no ensaio.....	32
Figura 4.4 - Sobrevivência (média±DP) de <i>Amphiprion frenatus</i> sujeitos a duas concentrações do método da “água verde”. O símbolo * identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ).....	34
Figura 4.5 – Comprimento total (média±DP) de <i>Amphiprion frenatus</i> sujeitos a duas concentrações do método da “água verde”. O símbolo * identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ).....	34
Figura 4.6 – Sobrevivência (média±DP) de <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controlo).....	43
Figura 4.7 – Comprimento total (média±DP) de <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controlo). O símbolo * identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ).....	43
Figura 4.8 – Peso (média±DP) de <i>Amphiprion ocellaris</i> alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controlo). O símbolo * identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value}<0,05$ ).....	44



## **Índice de tabelas**

Tabela 4.1 – Esquema de alimentação diária fornecida no decorrer do ensaio. ....	41
----------------------------------------------------------------------------------	----



# 1. Introdução

O hobby da aquariofilia tem atraído cada vez mais curiosos e entusiastas, principalmente na área dos peixes ornamentais marinhos. Estima-se que cerca de 1,5 a 2 milhões de pessoas mantenham aquários marinhos em casa (Dhaneesh *et al.*, 2012b). Este interesse é algo que ocorre a nível mundial devido à beleza e imensidão de cores que estes peixes podem apresentar (Ghosh *et al.*, 2012). A aquariofilia pode definir-se como o exercício da manutenção de peixes, plantas e outros organismos aquáticos em aquários ou outras estruturas naturais ou artificiais, com fins ornamentais, sendo uma atividade distinta da aquacultura, por não estar direcionada à produção. Esta é também uma atividade que combina o senso comum e os conhecimentos de algumas áreas mais técnicas e científicas. Muitas espécies de peixes e plantas podem ser mantidas em aquários, desde que se respeitem os limites e as necessidades de cada espécie. Ter um aquário marinho é cada vez mais popular embora mais dispendioso e difícil de manter comparativamente aos aquários de água doce. Ainda assim, os avanços técnicos têm contribuído para o aumento da popularidade dos aquários marinhos, pois as novas tecnologias tendem a simplificar a manutenção dos aquários domésticos (Moorhead & Zeng, 2010). Contudo, o poder de compra dos aquariofilistas é sem dúvida o que faz movimentar o mercado das espécies ornamentais. Enquanto muitas espécies de água doce são criadas em cativeiro com alguma facilidade, os organismos marinhos, por terem requerimentos mais exigentes e complexos, tornam-se mais difíceis de procriar em cativeiro, sendo esta a principal causa para o menor desenvolvimento da aquacultura ornamental marinha em comparação com a água doce (Palmtag & Holt, 2001).

O comércio de peixes ornamentais é uma fonte de crescimento para muitos países, principalmente na região do Indo-Pacífico (Saxby *et al.*, 2010; Thornhill, 2012). Esta indústria, incrementada na década de 1930, é atualmente uma indústria global que envolve milhões de euros demonstrando um aumento muito significativo ao longo das últimas décadas (Wabnitz *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2012; Rhyne *et al.*, 2012a). Paralelamente, o comércio de ornamentais sustenta a existência de um outro mercado multimilionário de aquários, sistemas de filtração e acessórios (O'Sullivan, 2008). É uma indústria muito importante principalmente para os países exportadores, em particular os países em desenvolvimento no Sudoeste Asiático (Leal *et al.*, 2016). Anualmente, em todo o mundo,

são comercializados cerca de 30 milhões de peixes marinhos de recife, correspondendo aproximadamente a 1800 espécies diferentes (Wabnitz *et al.*, 2003; Rhyne *et al.*, 2012b; Thornhill, 2012). Um estudo feito por Leal *et al.* (2016) entre 2000 e 2011, a nível europeu, demonstrou que a crise económica não afetou este comércio que representou um total de 135 milhões de euros neste intervalo de tempo. A nível mundial, o valor total do comércio de organismos ornamentais para aquariofilia varia de 800 milhões a 30 biliões de dólares por ano (Saxby *et al.*, 2010). Em 2016, Portugal constou nos dez primeiros exportadores de peixes ornamentais para a união europeia, o que se traduz no valor aproximado de 1 milhão de euros em exportações (OATA, 2017).

Ao contrário das espécies de água doce, onde mais de 90% são provenientes de aquacultura, a maioria das espécies nos aquários marinhos são provenientes de capturas no meio selvagem (Green, 2003; Wabnitz *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2011). Uma grande parte dos seres vivos presentes no mercado da aquariofilia são capturados da natureza utilizando métodos pouco destrutivos para o meio ambiente como por exemplo as redes e as armadilhas. Por outro lado, existe uma grande percentagem de organismos marinhos que são capturados utilizando métodos muito invasivos para os frágeis ecossistemas marinhos. Destes últimos, o cianeto e dinamite são os mais destrutivos (Wabnitz *et al.*, 2003). Após a captura, os animais devem ser submetidos a um período de quarentena e aclimação às condições em cativeiro sob um controlo rigoroso (Hadfield & Clayton, 2011). Após esta fase, o transporte aéreo permite a expedição destes seres vivos para quase todo o mundo, em poucas horas, desde que devidamente embalados e acondicionados. Durante o transporte, os peixes estão sujeitos a condições de stress tais como: oscilações de temperatura, permanência no escuro por muitas horas, degradação da qualidade da água e deficiências na nutrição (Olivotto *et al.*, 2017). Estima-se que, desde o recife até ao aquário, cerca de 60% a 70% dos animais morram durante a captura, no transporte ou manuseamento devido ao uso de produtos químicos, stress ou doenças precoces (Wabnitz *et al.*, 2003). Outras causas não menos importantes para a degradação destes habitats são, o desenvolvimento costeiro nas áreas de recifes, a dragagem de corais para fins de construção e as alterações ambientais a nível global (Bryant *et al.*, 1998; Wood, 2001). Ainda assim, apesar dos impactos no comércio de organismos ornamentais provenientes dos recifes de coral serem negativos, existem outras formas de analisar a situação. Se o mercado da aquariofilia marinha for gerido de uma forma sustentável, tem potencial para incentivar a conservação dos ecossistemas marinhos. De

certa forma, a distribuição de espécies ornamentais por mais de dois milhões de casas e aquários públicos em todo o mundo, contribui para consciencializar e educar as pessoas sobre a existência e situação dos ecossistemas dos recifes de corais (Nijman, 2009; Teitelbaum *et al.*, 2010). Outro procedimento para os aquaristas contribuírem para um comércio mais sustentável, é comprarem e exigirem espécies de origem certificada e controlada nas lojas habituais.

A forma alternativa e mais eficaz de atenuar a pressão exercida no meio selvagem será a produção em aquacultura de peixes ornamentais marinhos (Lubbock & Polunin, 1975; Rubec, 1988; Landau, 1992; Wood, 2001). De todas as espécies de peixes marinhos comercializadas, entre 1% e 10% são produzidos em aquacultura sendo os grupos mais produzidos, os Peixes palhaço, as Donzelas, os Góbios, os Cardinais e as *Pseudocromis* (Gopakumar, 2006; Domínguez & Botella, 2014). Apesar de todo o conhecimento existente, deverá desenvolver-se mais investigação sobre a biologia e ecologia das espécies mais populares (Wabnitz *et al.*, 2003; Moe, 2008). A possibilidade de recolha de informação sobre o ciclo de vida das diferentes espécies e a adaptação ao cativeiro dos organismos mais sensíveis, contribuirá para uma melhor gestão dos stocks naturais e ainda com melhorias no cultivo das diversas espécies (Wittenrich, 2007; Olivotto *et al.*, 2011). Também devem ser feitos esforços para potenciar a venda de espécies menos conhecidas mas que têm um enorme potencial de produção, aumentando o número de peixes produzidos e ainda a escolha para o cliente (Landau, 1992). O desenvolvimento de tecnologia em aquacultura é de extrema importância para que se afinem as condições ótimas de cultivo destes organismos em cativeiro. Este desenvolvimento só será possível quando se elaborarem protocolos de criação das mais variadas espécies (Landau, 1992).

Em aquacultura ornamental marinha, o principal ponto crítico da produção é a criação larvar sendo que o maior obstáculo é a mudança da alimentação endógena para exógena (Olivotto *et al.*, 2011). O desenvolvimento das larvas de peixe é portanto, bastante exigente em cativeiro, devido à dimensão destas, problemas com a alimentação e ainda a manutenção da qualidade da água (Dhaneesh *et al.*, 2012a). Estes são alguns dos principais motivos para que apenas se produzam com sucesso algumas espécies. A alimentação tem sido sem dúvida um dos temas mais discutidos e testados, mas, ainda assim, existem algumas questões sem resposta a este nível. O sucesso na produção de larvas e juvenis está em grande parte dependente da quantidade e qualidade do alimento vivo disponibilizado, para a sua

correta alimentação (Lim *et al.*, 2003). Existe uma grande panóplia de alimentos vivos disponíveis para as larvas onde se podem incluir várias espécies de microalgas, dinoflagelados, copépodes, rotíferos, ciliados e artémia (Olivotto *et al.*, 2017). Atualmente, a maioria dos cultivos larvares é realizado recorrendo ao uso de rotíferos (*Brachionus* sp.) seguidos de náuplios e metanáuplios de artémia (*Artemia* sp.) (Cheng *et al.*, 2004). Todos eles são muito utilizados pelo facto de terem uma natureza planctónica, porque são facilmente cultivados em grandes densidades e também porque o seu perfil nutricional pode ser alterado recorrendo ao enriquecimento (Sargent *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1999; Olivotto *et al.*, 2011). A alimentação com rotíferos e artémia é uma realidade que funciona muito bem para algumas espécies mas, existem outras em que esta dieta não é suficiente para o sucesso do desenvolvimento larvar. Isto deve-se ao facto destas larvas terem uma dimensão da boca muito reduzida, sendo de extrema importância o uso de alimento com tamanho adequado para o correto desenvolvimento larvar (Côrtes & Tsuzuki, 2010). Contudo, observam-se melhorias das tecnologias de cultivo, estando a família Pomacentridae, onde se incluem os peixes-palhaço, envolvida numa grande parte das experiências realizadas (Olivotto *et al.*, 2003).

No entanto, existem muitos outros elementos que poderão ter influência nas taxas de sobrevivência e sucesso na criação das larvas destes peixes. Na natureza, são muitos os fatores que interagem com as larvas de peixe e que são determinantes para o seu correto desenvolvimento. Estes mesmos fatores não devem ser descurados na produção em cativeiro apesar da pouca informação disponível na maioria dos casos. Para além da alimentação larvar, como já foi explicado, existem outras etapas críticas, nomeadamente na desova, no desenvolvimento dos embriões e na eclosão (Olivotto *et al.*, 2011). Isto poderá ser justificado com a maturidade dos reprodutores, com a qualidade da sua alimentação, com a estratégia reprodutiva e ainda com fatores genéticos. As condições ambientais (qualidade da água, temperatura, iluminação, fotoperíodo, etc) devem ser controladas de forma a respeitar o melhor para cada espécie, de acordo com os estudos existentes. Por outro lado, em cativeiro, existem alguns procedimentos cruciais (que não ocorrem no meio natural) para tornar a produção larvar possível, facilitada e confiável, sendo necessário um maior esforço na investigação desta área em específico (Moorhead & Zeng, 2010). É necessário conhecer e melhorar as técnicas utilizadas na criação destes seres, aperfeiçoar os métodos de manejo e adaptar as condições em cativeiro aos requisitos de cada espécie.

## 2. Objetivos

No âmbito da unidade curricular de Estágio do segundo ano do mestrado de Aquacultura, do Instituto Politécnico de Leiria, na Escola Superior de Turismo e Tecnologia de Mar do Peniche, realizou-se o estágio na empresa AQUASPROSEA.

O primeiro objetivo deste estágio teve como foco a aquisição de competências teóricas e práticas na área da aquariofilia ornamental no meio empresarial. Neste caso concreto, a produção de espécies ornamentais marinhas incluindo todas as etapas e rotinas necessárias à obtenção de juvenis prontos para venda.

Por outro lado, numa maternidade de organismos ornamentais marinhos existem alguns obstáculos a nível prático, ainda sem respostas. É aqui que surge o outro grande objetivo deste trabalho, o estudo de alguns dos problemas existentes de forma a otimizar procedimentos e melhorar a eficiência produtiva da empresa. As problemáticas estudadas foram:

- Efeito dos métodos de captura na sobrevivência larvar do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*.
- Influência da concentração da “água verde” na sobrevivência e crescimento do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus*.
- Influência do desmame na sobrevivência e crescimento de juvenis do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*.



### 3. Descrição do estágio

Neste capítulo será feita uma explicação detalhada da empresa onde se realizou o estágio, descrevendo-se a estrutura das suas instalações, a organização do ciclo de produção, as espécies produzidas e ainda as tarefas e rotinas desenvolvidas diariamente. Este estágio teve uma duração de 1620 horas, iniciando-se em setembro de 2017 e terminando em junho de 2018.

#### 3.1. A empresa

A AQUASPROSEA Lda, fundada a 20 de agosto de 2015, é uma das startups da START-IDEA - Espaço de Acolhimento de Ideias e Projetos da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM) de Peniche, pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria.

É uma empresa que labora na área da aquacultura e que se destina à produção e venda de organismos aquáticos ornamentais marinhos. Embora parte das vendas sejam para o mercado nacional, o principal objetivo é a exportação para vários pontos da Europa. Tem ainda como missão promover um mercado sustentável de organismos para o hobby da aquariofilia, competindo com a captura de espécimes selvagens.



Figura 3.1 – Logótipo da empresa.

## 3.2. Instalações

As instalações da AQUASPROSEA localizam-se em Peniche e diferenciam-se essencialmente em dois tipos de espaços, as zonas de produção e a zona de pessoal. A figura 3.2 representa esquematicamente a planta do edifício inclusive os diversos espaços diferenciados.

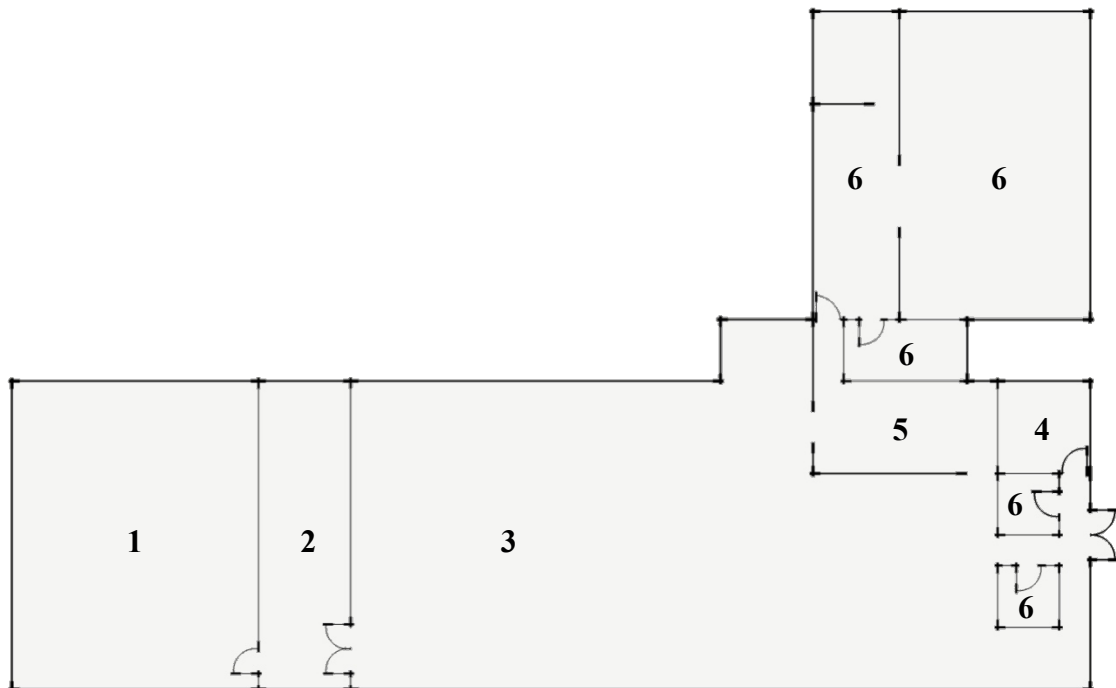


Figura 3.2 - Planta das instalações da empresa. Legenda: 1 – Zona de reprodutores, pré-engorda e cultivo larvar; 2 – Zona de cultivos auxiliares e embalamento; 3 – Zona de engorda; 4 – Zona de quarentena; 5 – Área de lavagens; 6 – Área de Pessoal.

### 3.2.1. Zona de reprodutores, pré-engorda e cultivo larvar

É aqui, nesta sala, que se realiza grande parte do ciclo produtivo uma vez que nela são mantidos os reprodutores, é feito o cultivo larvar e ainda a pré-engorda. O espaço é mantido a uma temperatura controlada e adequada a estes organismos ornamentais. O fotoperíodo, um parâmetro importante, é também controlado traduzindo-se em 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Inclui também um depósito de armazenamento de água salgada, aquecido, para que não ocorram choques térmicos nos peixes quando se fazem trocas ou reposições de água nos sistemas.

Os casais das várias espécies de reprodutores estão individualizados em aquários de diversas dimensões de acordo com as exigências de cada uma. Estes aquários estão também separados em seis sistemas de recirculação independentes (Fig. 3.3). Cada sistema possui uma sump onde se realiza a filtração mecânica, química e biológica. A água passa primeiramente num filtro de saco (200  $\mu\text{m}$ ) e de seguida por um escumador. Logo depois flui pelas biobolas (filtração biológica), carvão ativado e por fim é bombeada para os aquários passando antes por um esterilizador ultravioleta (UV).

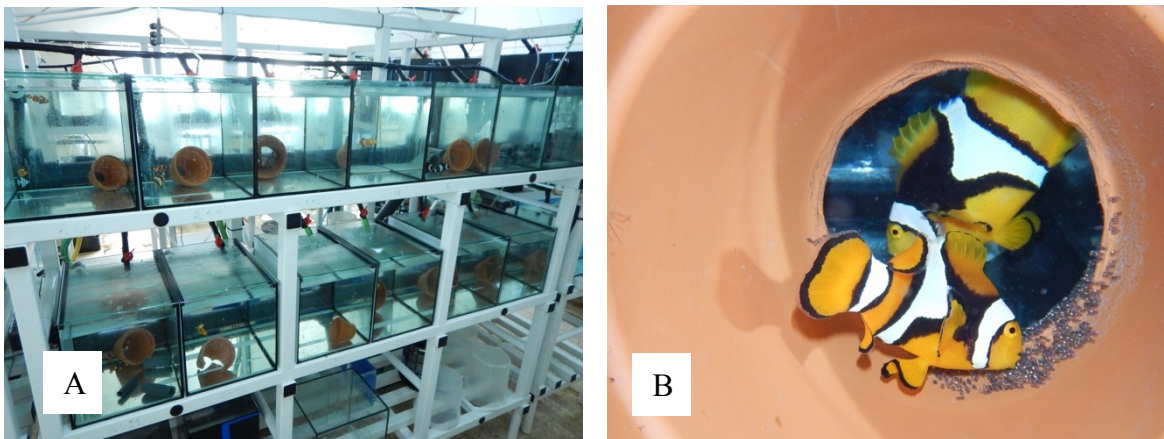


Figura 3.3 – (A) Sistema de reprodutores; (B) Casal de *Amphiprion percula* e respetiva postura.

O cultivo larvar é feito em aquários com os vidros pretos num sistema aberto (Fig. 3.4 A). As larvas estão separadas por espécie e data de eclosão. Aqui existe um reservatório com água salgada esterilizada com radiação UV que é bombeada gota-a-gota para cada aquário. Desta maneira é feita uma troca de água lenta, 24 horas por dia, por forma a manter os parâmetros de qualidade ideais para estes seres vivos. A água que sai dos aquários vai diretamente para o esgoto não sendo reaproveitada.

A pré-engorda ocorre em aquários transparentes de vários volumes (Fig. 3.4 B) e estão separados em dois sistemas de recirculação independentes. Ao nível do tratamento da água, os métodos e equipamentos utilizados são idênticos aos descritos para os sistemas dos reprodutores.

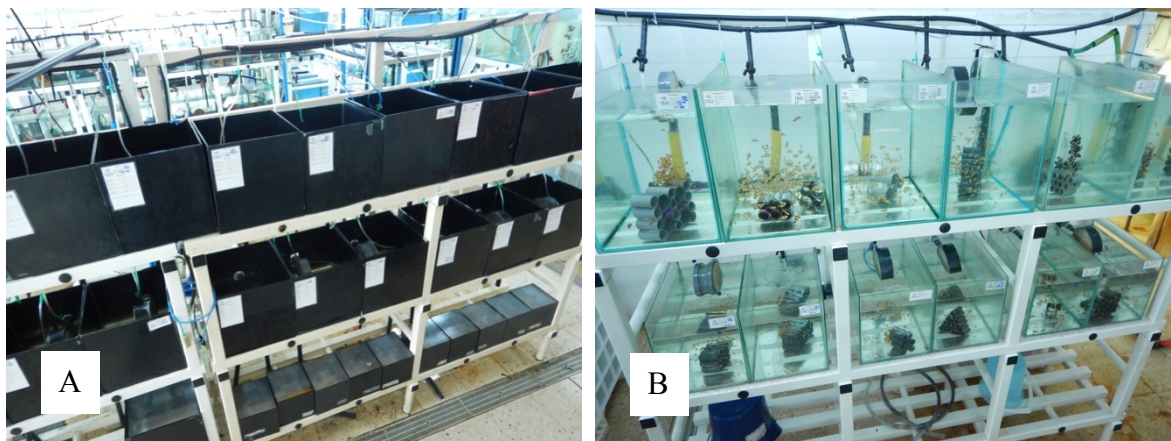


Figura 3.4 – (A) Sistema de cultivo larvar; (B) Sistema de pré-engorda.

### 3.2.2. Zona de cultivos auxiliares e embalagem

Nesta área realizam-se todos os cultivos auxiliares à produção, nomeadamente microalgas, rotíferos e artémia (Fig. 3.5). O espaço está também a uma temperatura controlada para otimizar o crescimento dos cultivos. O fotoperíodo é de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

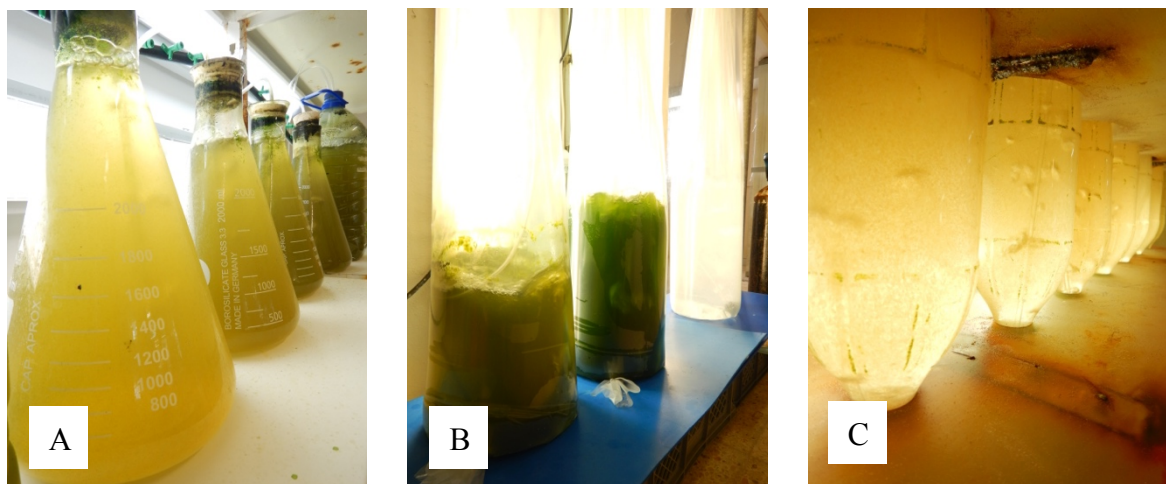


Figura 3.5 – Representação dos vários cultivos auxiliares realizados na empresa. (A) Rotíferos; (B) Rotíferos e microalgas; (C) Artémia.

Para além da manutenção de cultivos stock de microalgas, estas são cultivadas em erlanmeyers, garraões e mangas. Os rotíferos são produzidos em erlanmeyers e mangas. Por fim a artémia eclode em recipientes cilindrocónicos. Os rotíferos e a artémia, antes de serem fornecidos às larvas, são enriquecidos também neste local.

O embalagem dos seres vivos para venda é efetuado neste local recorrendo a todos os consumíveis necessários (sacos plástico, fita cola, elásticos, caixas isotérmicas e caixas de cartão) não esquecendo ainda a garrafa de oxigénio puro.

### 3.2.3. Zona de engorda

Após a saída dos indivíduos da fase de pré-engorda, são transferidos para os tanques de engorda (Fig. 3.6 A) onde é feito o crescimento final antes da venda. O fotoperíodo neste local é de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Existe também um depósito de armazenamento de água salgada, aquecido, para o mesmo efeito referido no ponto 3.2.1.

Os peixes para engorda encontram-se em tanques de fundo e paredes brancas como se pode observar na figura 3.6 (A). Estes tanques estão separados em três sistemas de recirculação de água independentes, cada um com uma sump. A filtração mecânica, química e biológica ocorre em primeiro lugar no filtro de saco (200 µm) e depois no escumador. Logo de seguida a água passa pelas biobolas e resistências de aquecimento e por fim é bombeada para os tanques, passando antes por um esterilizador UV.

Os aquários da figura 3.6 (B) pertencem a outro sistema de recirculação que é utilizado para preparar os peixes que vão ser vendidos (triagem e jejum). Os métodos de purificação da água são idênticos aos descritos para os sistemas de engorda.

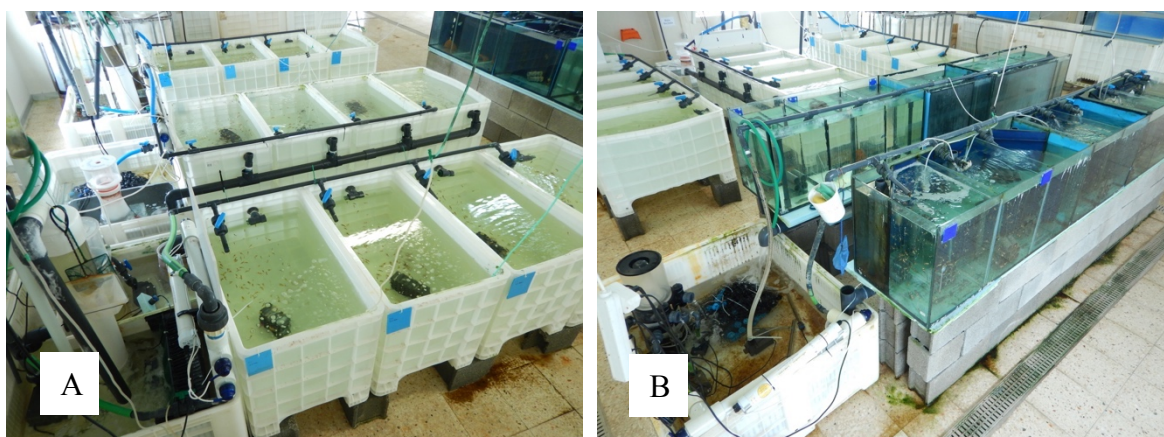


Figura 3.6 - (A) Sistemas de engorda. (B) Sistema de preparação de saída de peixes.

### 3.2.4. Zona de quarentena

Esta é uma área bastante importante porque é onde se mantêm os peixes em isolamento quando são detetadas patologias ou quando são rececionados peixes (ex: novos reprodutores). Por este motivo está bastante distanciada e separada de todas as outras zonas para evitar contaminações. É composta por um sistema de quatro aquários com uma sump que mantém a água em constante circulação. Para além das resistências de aquecimento, existe apenas desinfeção por ultravioletas pois a qualidade da água é mantida recorrendo trocas muito regulares. Conforme as necessidades são colocados outros aquários individuais para efetuar os tratamentos devidos.

### 3.2.5. Área de lavagens

Todo o material utilizado nas instalações é lavado e desinfetado aqui na área de lavagens (Fig. 3.7). Os reagentes e produtos de limpeza também são aqui armazenados e identificados.



Figura 3.7 - Área de Lavagens.

### 3.2.6. Zona técnica e de pessoal

Na área técnica está o depósito de receção de água salgada. Esta água quando é rececionada, é filtrada num sistema de cartuchos de 200  $\mu\text{m}$ . Após isto, a água está em constante circulação pelas zonas de produção passando por radiação UV. Também é desta zona que é enviado o arejamento para todos os locais recorrendo a um compressor de ar. As áreas de pessoal incluem um armazém, o escritório, a sala de convívio e os sanitários.

### 3.3. Ciclo geral de produção

Na AQUASPROSEA, apesar das várias espécies produzidas, existe um ciclo produtivo generalizado para todas elas (Fig. 3.8). O objetivo final é obter indivíduos juvenis das demais espécies, com diferentes tamanhos (critério de seleção), para a sua posterior venda.

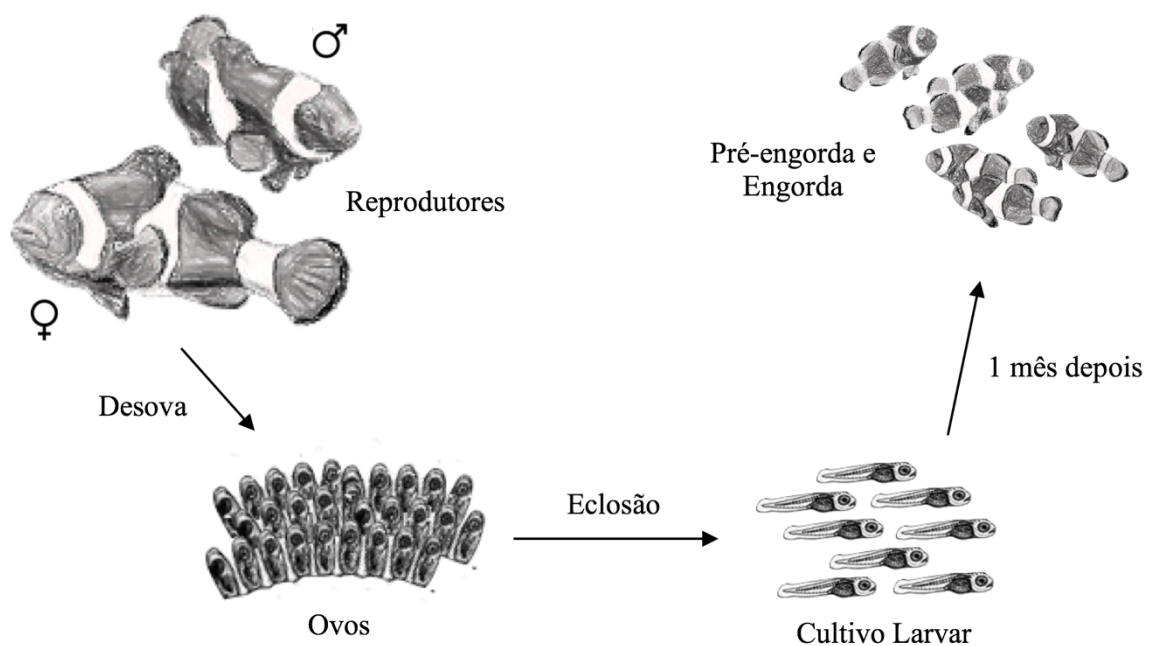


Figura 3.8 – Esquema do ciclo geral de produção da empresa, neste caso representado pela espécie *Amphiprion ocellaris*.

O ciclo começa com a correta manutenção dos casais de reprodutores. São-lhes fornecidas todas as condições para que estejam bem aclimatizados (tamanho do aquário, esconderijos e locais para posturas) e bem nutridos, de forma a obter ovos da melhor qualidade possível. As larvas eclodem após o período de tempo necessário de incubação dos ovos, na maioria das vezes dentro dos aquários dos reprodutores. Estas são recolhidas para os aquários de cultivo larvar, separadas por espécie e data de eclosão. Aqui, as larvas são alimentadas com rotíferos e artémia, todos produzidos nas instalações da empresa. Ultrapassada a fase larvar, os indivíduos com a metamorfose concluída, já são juvenis aptos a serem transferidos para a pré-engorda. Aqui, para além do alimento vivo, introduz-se lentamente a alimentação inerte. Concluído o desmame do alimento vivo e após atingirem o tamanho ideal, os peixes são transferidos para os tanques de engorda onde ocorre o crescimento final antes de serem vendidos.

## 3.4. Espécies Produzidas

### 3.4.1. Peixe-Palhaço

O conhecido peixe-palhaço é um dos mais atraentes e desejados peixes ornamentais marinhos. Conhecem-se 30 espécies deste peixe (Froese & Pauly, 2014), pertencendo todas ao género *Amphiprion* exceto o peixe-palhaço tomate que pertence ao género *Premnas*. De todas estas espécies, na AQUASPROSEA são produzidas as seguintes: *Amphiprion ocellaris*, *Amphiprion percula*, *Amphiprion clarkii*, *Amphiprion frenatus*, *Amphiprion sandaracinos* e *Premnas biaculeatus*.

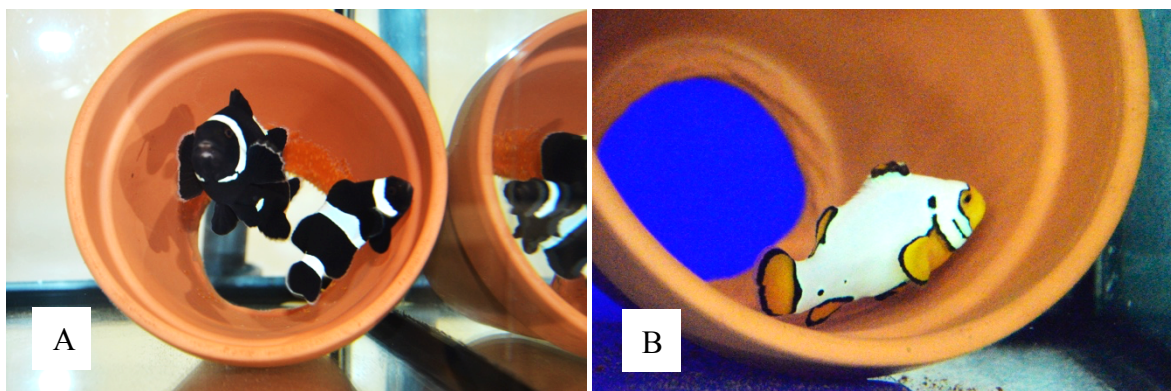


Figura 3.9 – Variações de *Amphiprion ocellaris*: (A) Variação Black Ocellaris; (B) Variação Premium Snowflake

Existe alguma complexidade na forma como estes peixes se organizam socialmente. Daqui resulta a diferenciação sexual e diferenças nas taxas de crescimento. São organismos hermafroditas sequenciais protândricos, sendo inicialmente machos alterando depois para fêmeas de acordo com a estrutura social (Ajithkumar *et al.*, 2012). Na produção em cativeiro, juntam-se dois indivíduos que, em princípio, formarão um casal pela diferenciação de um deles em fêmea (geralmente o maior). Ao nível da alimentação dos adultos, é uma espécie que aceita uma grande diversidade de alimentos. No entanto, os reprodutores devem ser alimentados com uma grande variedade de dietas frescas, congeladas e ainda rações (Madhu *et al.*, 2006). Só assim, fornecendo os nutrientes necessários, é possível obter ovos de boa qualidade e um crescimento adequado. Em condições ideais, estes casais fazem posturas durante todo o ano. Para tal necessitam de um substrato como por exemplo vasos de barro, que em cativeiro, funcionam muito bem em alternativa às anémonas (Madhu *et al.*, 2013). Antes da desova é feito um ritual de limpeza da zona onde ficarão os ovos.

O desenvolvimento dos embriões desenrola-se com grandes cuidados parentais, maioritariamente pelo macho (Madhu *et al.*, 2013). Os ovos são agitados frequentemente para se manterem oxigenados e sem fungos (Delbare *et al.*, 1995; Green & McCormick, 2005). Também existe o cuidado da remoção dos ovos que não estão viáveis. A postura à medida que se vai desenvolvendo apresenta grandes alterações na sua coloração (Wilkerson, 1998). Começa por ser de cor clara, escurecendo depois de alguns dias e por fim os embriões ficam com os olhos prateados, indicativo de que a eclosão está próxima.

As larvas recém eclodidas já possuem um sistema digestivo funcional, apenas têm reservas vitelinas para as primeiras 24 horas e o seu comprimento total varia de acordo com a espécie (Madhu *et al.*, 2012). Deve ser introduzida a primeira alimentação constituída inicialmente por rotíferos e posteriormente artémia (Wittenrich, 2007; Olivotto *et al.*, 2011). Estas presas vivas devem ser enriquecidas com dietas comerciais para otimizar as taxas de sobrevivência e crescimento (Sargent *et al.*, 1999; Avella *et al.*, 2007). Para além do alimento é importante que as larvas estejam em aquários com as laterais pretas e também deve ser utilizado o método da água verde. Devido à extrema sensibilidade das larvas nestas fases é necessário manter a melhor qualidade/estabilidade da água possível.

### **3.4.2. Góbios**

A família Gobiidae é constituída aproximadamente por 1700 espécies divididas em 250 géneros (Froese & D., 2013). Na empresa apenas se produzem duas espécies: *Elacatinus fígaro* (Fig. 3.10 A) e *Elacatinus oceanops* (Fig. 3.10 B). Os góbios estão presentes numa grande variedade de ambiente marinhos e ainda nos mais diversos tipos de habitats e substratos (Herler *et al.*, 2011; Froese & D., 2013). A grande maioria das espécies são bentónicas, tem um tamanho pequeno e um corpo alongado exibindo comportamentos territoriais. A formação dos casais deve ser realizada com cuidado porque os machos podem-se tornar agressivos principalmente se o aquário for de pequenas dimensões (Olivotto *et al.*, 2005; Herler *et al.*, 2011). Antes da desova é possível verificar que a fêmea possui o abdómen inchado e que o macho realiza a limpeza do substrato (Olivotto *et al.*, 2005; Wittenrich, 2007). Nestas duas espécies, os machos também demonstram cuidados parentais enquanto as fêmeas maturam novas posturas. O desenvolvimento dos embriões pode demorar entre 5 e 10 dias dependendo da espécie e da temperatura (Calado *et al.*, 2017). A eclosão das larvas normalmente acontece depois de escurecer.

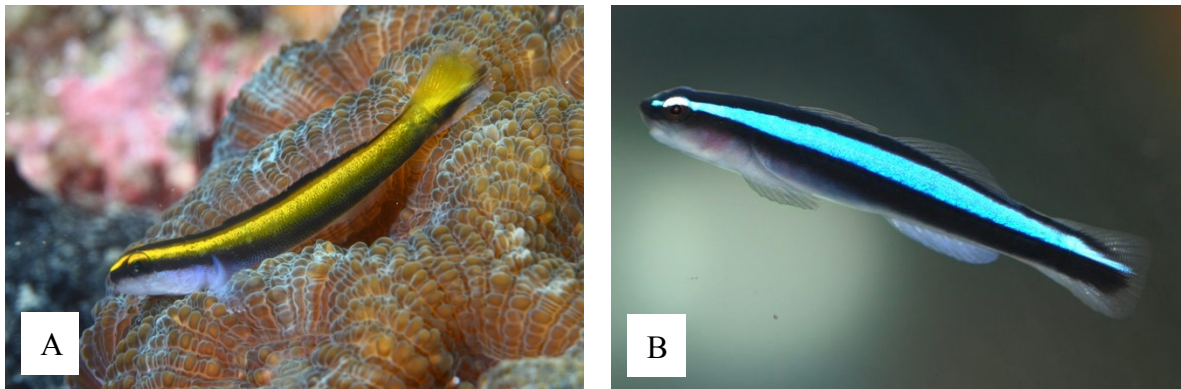


Figura 3.10 - (A) *Elacatinus figaro*; (B) *Elacatinus oceanops*. Fontes: [www.amongthereef.com](http://www.amongthereef.com); [www.icmbio.gov.br](http://www.icmbio.gov.br).

O adequado cultivo larvar destes peixes é fundamental para se obterem bons resultados. Tal como se faz com as larvas de peixe-palhaço, estas devem ser colocadas também em aquários com as laterais pretas e com a água escurecida pelo método da água verde. A alimentação é um dos fatores cruciais para o adequado desenvolvimento das larvas que, após eclodirem, tem uma boca com tamanho suficiente para se alimentarem com rotíferos (Olivotto *et al.*, 2005; Shei *et al.*, 2010; Cortes & Tsuzuki, 2011). O uso de zooplâncton de menores dimensões, como por exemplo ciliados *Euplotes* sp., podem resultar numa maior taxa de sobrevivência. A alimentação deve ser fornecida em quantidades adequadas e devidamente enriquecida. É também essencial manter a água com a melhor qualidade possível. Apesar de os góbios serem bastante relevantes no comércio ornamental, existem apenas alguns estudos que permitam compreender a sua reprodução e o desenvolvimento larvar (Olivotto *et al.*, 2005; Meirelles *et al.*, 2009; Shei *et al.*, 2010; Cortes & Tsuzuki, 2011; Shei *et al.*, 2012; Pedrazzani *et al.*, 2014).

### 3.4.3. Pseudochromis

Existem cerca de 150 espécies divididas em 23 géneros pertencentes à família Pseudochromidae (Froese & D., 2013). Três delas são produzidas na AQUASPROSEA: *Pseudochromis fridmani* (Fig. 3.11 A), *Pseudochromis flavivertex* (Fig. 3.11 B) e *Pseudochromis aldabraensis*. Em comparação com os peixes-palhaço, estas espécies têm um impacto bastante significativo no comércio de peixes ornamentais marinhos (Wittenrich, 2007). São reconhecidos pelo seu corpo pequeno, alongado e por exibirem uma grande variedade de cores e padrões que se destacam.

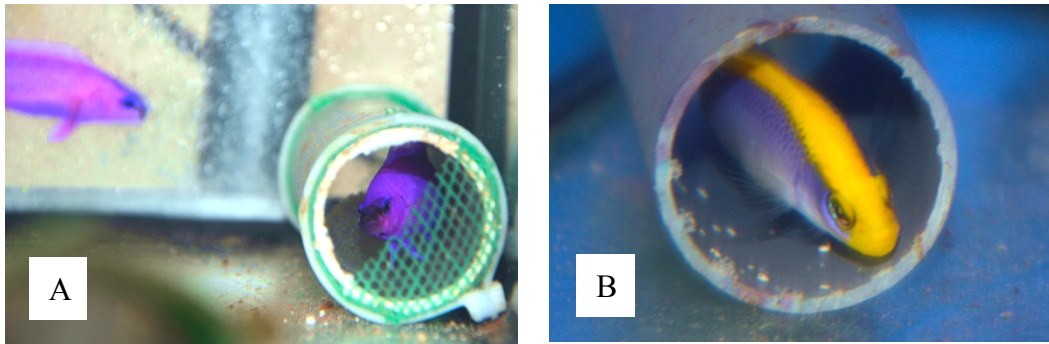


Figura 3.11 – (A) *Pseudochromis fridmani*; (B) *Pseudochromis flavivertex*.

Ao nível da reprodução, as espécies aqui produzidas são hermafroditas sequenciais protogínicas embora existam outras que são hermafroditas sequenciais protândricas (Wittenrich, 2007). No entanto em algumas espécies pode ocorrer a mudança de sexo várias vezes. Na altura da reprodução, a fêmea apresenta o abdómen inchado, indicando que a postura será colocada nos dias seguintes. Ao contrário dos peixes-palhaço e dos góbios, os ovos não ficam agarrados a nenhum substrato. Na colocação da postura, a fêmea liberta os ovos que vão sendo fertilizados logo de seguida pelo macho. Os ovos, após serem fertilizados, vão-se enrolando formando uma massa de ovos oval, todos unidos por fios adesivos (Mooi, 1990). Mais uma vez, o macho é que fica encarregue de proteger e oxigenar os embriões até ao dia da eclosão (Olivotto *et al.*, 2006; Wittenrich, 2007). O tempo do desenvolvimento embrionário pode variar com a temperatura, demorando 4 a 6 dias a dar-se a eclosão (Brons, 1996; Olivotto *et al.*, 2006; Wittenrich, 2007).

As larvas possuem pequenas reservas vitelinas começando logo à procura de presas para se alimentarem. A boca destas larvas para além de ser pequena é menos desenvolvida comparando, por exemplo, com os peixes-palhaço (Wittenrich & Turingan, 2011). Isto constitui um problema na altura de fornecer um alimento vivo adequado a estas pequenas larvas. O ideal é fornecer rotíferos e náuplios de artémia enriquecidos, sendo também aconselhável utilizar o método da água verde (Olivotto *et al.*, 2006). A produção larvar de *Pseudochromis* pode ficar marcada por elevadas taxas de mortalidade relacionadas com problemas nutricionais e fisiológicos (Olivotto *et al.*, 2006; Wittenrich, 2007; Holt, 2011). Em condições ideais, a metamorfose ocorre 23 a 35 dias após a eclosão (Olivotto *et al.*, 2006). Alguns fatores pouco estudados ainda dificultam a produção destas espécies em cativeiro, tais como o sucesso da eclosão e a mortalidade larvar devido em grande parte à alimentação (Mies *et al.*, 2014).

### 3.5. Tarefas e rotinas

A manutenção de sistemas de água salgada requer alguns procedimentos essenciais para evitar perdas de elementos vivos e avançar com uma produção bem-sucedida. São por isso estabelecidas rotinas na empresa onde inúmeras tarefas são desenvolvidas com diferentes periodicidades. De seguida serão descritas todas as tarefas realizadas diariamente, semanalmente e ainda as que se fazem apenas quando necessário.

#### 3.5.1. Diárias

**Verificação de organismos e anomalias:** A primeira tarefa a ser executada assim que se chega às instalações é a existência de alguma anomalia nos sistemas de um modo geral. Se necessário é feita a sua correção/reparação de forma a manter o bom funcionamento. De seguida, e de extrema importância, a verificação de indivíduos mortos que são imediatamente retirados para não degradar a qualidade da água.

**Alimentação:** Este é um dos procedimentos mais importantes realizado diariamente e que requer muita atenção devido às quantidades a fornecer e aos diversos alimentos fornecidos em cada etapa da produção. As diferenças nas dietas devem-se aos requisitos básicos de cada fase de desenvolvimento dos peixes (larvas, juvenis e adultos reprodutores). O que varia em cada uma é o tipo de dieta, o tamanho, o facto de ser alimento vivo ou inerte e ainda a composição nutricional.

Os reprodutores são alimentados 4 a 5 vezes ao dia com ração, moluscos, ovas de peixe e outros alimentos congelados como artémia e pequenos camarões. É muito importante um bom fornecimento de ácidos gordos essenciais entre outros nutrientes para o correto desenvolvimento e maturação dos ovos (Olivotto *et al.*, 2006; Madhu *et al.*, 2016). Estes fatores serão refletidos na qualidade das posturas e também das larvas.

Às larvas, dependendo das suas idades, são fornecidos inicialmente rotíferos (*Brachionus* sp.) na concentração de 10-20 ind./mL e mais tarde náuplios de artémia (*Artemia* sp.) na densidade de 1-2 ind./mL. Para além de serem alimentos vivos, são fáceis de produzir e têm o tamanho adequado à boca das larvas para serem facilmente ingeridos. Nutricionalmente possuem algumas carências que são corrigidas pelo processo de bioencapsulação. O enriquecimento destes alimentos vivos é feito com uma dieta comercial

(Red Pepper, Bernaqua) que fornece grandes quantidades de ácidos gordos essenciais e vitaminas. Desde a eclosão das larvas até ao momento em que começam a comer artémia, a água dos aquários da larvicultura é mantida com a microalga *Nannochloropsis oculata* na concentração de 3 500 000 células por mililitro. É um método designado “água verde”, utilizado para aumentar o contraste das presas, manter a qualidade nutricional do zooplâncton e reduzir o stress das larvas pela atenuação da luz. As presas vivas e a microalga são adicionadas várias vezes ao dia de forma a manter as concentrações ideais para este tipo de cultivo larvar.

Os peixes juvenis, quando são transferidos para a pré-engorda, alimentam-se ainda de artémia viva enriquecida e começam a comer alimentos congelados e ração. São fornecidos 4-5 vezes por dia. Nesta etapa é feito o desmame do alimento vivo para o alimento inerte sendo que, quando vão para as engordas, já só comem ração.

Nas engordas, ao longo de todo o dia, são fornecidas porções de ração suficientes para manter os indivíduos saciados, promovendo uma ótima taxa de crescimento.

**Qualidade da água:** Na área da aquacultura, a qualidade da água é outro fator de extrema importância que influencia o bem-estar e o desenvolvimento dos seres vivos aquáticos. A avaliação da qualidade da água num ambiente controlado é feita através da medição de alguns parâmetros físico-químicos. Na empresa são avaliados a temperatura, a salinidade, a amónia e os nitritos.

A temperatura e a salinidade são medidas diariamente sendo fatores muito importantes na produção ornamental. As espécies provenientes de recifes tropicais podem viver numa faixa aceitável de temperaturas sendo que cada uma tem um valor ideal. Em alguns casos, temperaturas mais elevadas influenciam a reprodução e o crescimento. Tendo em conta as espécies e as fases de produção, na AQUASPROSEA, as temperaturas dos sistemas podem estar entre os 24°C e os 28°C sendo verificadas com termómetros. A salinidade média dos oceanos é 35 sendo este um nível de referência na manutenção de organismos aquáticos marinhos. No entanto, as salinidades dos sistemas são mantidas com valores mais próximos de 30, funcionando como medida preventiva ao desenvolvimento de patologias. Valores mais baixos proporcionam um desenvolvimento e propagação mais lento destes agentes permitindo uma resposta mais eficaz por parte do sistema imunológico dos

peixes (Lei & Poulin, 2011). Este parâmetro é avaliado com um refratômetro (TMC V2 Refractometer).

Os compostos azotados como a amónia e os nitritos são muito pouco tolerados pela maioria das espécies ornamentais marinhas. A sua elevada toxicidade pode provocar algumas alterações nos peixes sendo que, nos casos mais graves, pode levar à morte dos indivíduos (Demeke & Tassew, 2016). A filtração biológica deve manter os níveis de amónia e nitritos próximos de zero devendo estar bem dimensionada para tal. O que acontece neste tipo de filtração é a conversão de amónia em nitritos e estes últimos são transformados em nitratos, tudo isto com a intervenção de bactérias. Os nitratos são os menos tóxicos para os peixes sendo toleráveis em concentrações mais elevadas, no entanto devem ser diluídos recorrendo a trocas de água periódicas. As concentrações de amónia e nitritos são verificadas uma vez por semana recorrendo a testes rápidos (API test).

Associado também à qualidade da água estão as condições dos sistemas de filtração. Por isso, diariamente são limpas todas as partes dos sistemas de suporte de vida sujeitas a acumulação de matéria orgânica, nomeadamente os sacos de filtração e os escumadores. Outro procedimento realizado na empresa ao final da tarde é a aspiração do fundo de todos os aquários e tanques. Isto serve para retirar todos os desperdícios de alimentos e ração fornecidos, evitando que a sua decomposição degrade a qualidade da água.

**Cultivos auxiliares:** Como já foi referido anteriormente, para a alimentação das larvas é necessário produzir rotíferos e artémia. Toda a água salgada utilizada na produção destes seres é previamente desinfetada e depois neutralizada para prevenir contaminações.

Na produção de rotíferos são utilizados erlanmeyers de 2 litros e mangas de 60 litros por forma a manter a produção necessária aos requisitos diários da empresa. Nos erlanmeyers é utilizado o método de produção semi-contínuo. De acordo com este método, quando é necessário, retira-se uma parte do volume de cultivo que é repostado com água nova. Desta forma é possível manter a cultura ao longo do tempo devido às renovações do meio. Diariamente é também adicionada a microalga *Nannochloropsis oculata*, a todos os cultivos. No caso das mangas é feito um cultivo descontinuo. Começa com um cultivo de microalga (*N. oculata*) e após a cultura atingir a concentração desejada (fase de crescimento exponencial) é inoculada com rotíferos. Quando a população de rotíferos se multiplica até níveis pretendidos, começa-se a utilizar este cultivo até este se esgotar na totalidade.

Diariamente, todos os cultivos são contados à lupa binocular para se determinar a sua concentração. Este procedimento é útil para perceber o estado de cada cultivo e ainda que quantidade se deve fornecer às larvas tendo em conta a densidade.

A artémia é adquirida pela empresa no estado de cistos já descapsulados. Assim todos os dias estes cistos são colocados em recipientes cilindrocónicos para eclodirem, com luz constante e arejamento forte. Após a eclosão estar concluída os náuplios são transferidos para outros recipientes com água salgada nova para serem enriquecidos.

Todas estas espécies antes de serem fornecidas como alimento às larvas passam por um processo de enriquecimento. São colocados em recipientes, separados dos de cultivo, e é adicionado o enriquecimento comercial (Red Pepper, Bernaqua) de acordo com as especificações do fabricante. Após 12 horas estão aptos a serem fornecidos aos cultivos larvares.

**Eclosão de Posturas:** Todos os dias existem posturas com o tempo de incubação necessário para se dar a eclosão. O tempo de incubação pode variar entre 4 e 8 dias, variando principalmente com a espécie e com a temperatura da água. A eclosão ocorre ao final do dia após o por do sol, altura em que deixa de existir luz.

A transferência das larvas para os aquários de cultivo larvar pode ocorrer de duas formas: a primeira consiste em deixar os ovos junto dos reprodutores e, quando a eclosão termina as larvas são retiradas cuidadosamente para o aquário de cultivo larvar; o segundo método pode ser feito sempre que for possível retirar a postura do aquário dos progenitores. Antes do anoitecer é retirada a estrutura que contem os ovos para o aquário de cultivo larvar e fica com arejamento sob os ovos para ocorrer a eclosão depois de escurecer. Posto isto é necessário ir todas as noites capturar as larvas nascidas e/ou retirar o(s) vaso(s) e reduzir o arejamento dos aquários já com as larvas eclodidas.

### 3.5.2. Semanais

**Manutenção de sistemas:** Uma vez por semana, os aquários e tanques de todos os sistemas de produção são limpos com uma esponja para se manter a visibilidade para o interior dos mesmos. Serve também para manter o controlo de infestantes como algumas microalgas e pólipos de anémonas. Para além disto são feitas outras intervenções, quando necessário, ao nível dos sistemas de filtração para manter o seu bom funcionamento. Também é feita uma

troca de água parcial para remover resíduos que se vão acumulando e que só se conseguem retirar desta forma. Esta é outra medida que permite manter uma qualidade da água adequada aos organismos em todos os sistemas.

**Limpezas:** A limpeza e desinfecção das áreas de produção é realizada também uma vez por semana. Consiste na desinfecção das superfícies de trabalho e do chão com detergentes à base de lixívia. Também se colocam alguns utensílios utilizados vulgarmente nas diversas etapas de produção, numa solução desinfetante de água e lixívia comercial.

### 3.5.3. Ocasionais

**Desinfecção de depósitos:** Quando é possível, os depósitos de armazenamento de água salgada são desinfetados com lixívia comercial sendo depois esvaziados por completo antes de receberem nova água. Este é um procedimento que previne o desenvolvimento de patologias e também de infestantes como é o caso das microalgas. Esta rotina serve também para desinfetar todas as tubagens e mangueiras diretamente relacionadas com estes depósitos.

**Embalamento:** Quando existe encomendas por parte dos clientes da empresa é necessário preparar todo o processo de embalamento. Para garantir o bem-estar dos animais durante a expedição até ao cliente é necessário ter em conta alguns aspetos. Em primeiro lugar, no dia anterior os peixes são triados de acordo com o pedido e são colocados nos aquários do sistema de saída de peixes. Aqui ficam em jejum até ao momento do embalamento. Os peixes ao estarem em jejum vão poluir muito menos a água e consumir menos oxigénio derivado do processo de digestão.

Na manhã do embalamento os peixes são apanhados para sacos duplos de plástico com as bordas arredondadas, sendo divididos de acordo com a espécie, tamanho e temperamento. Os sacos possuem uma parte de água salgada (1/3) e o restante de oxigénio puro (2/3). De seguida são colocados todos os sacos em caixas isotérmicas de esferovite forradas com jornal e com sacos de calor para manter a temperatura ideal durante a viagem. Estando tudo bem-acondicionado, as caixas referidas anteriormente são fechadas e colocadas em caixas de cartão com a identificação da empresa e da transportadora. Deste modo ficam garantidas as condições ideais para o transporte destes seres vivos, aumentando o bem-estar e evitando mortalidades indesejadas.

## **4. Ensaio Experimentais**

### **4.1. Efeito dos métodos de captura na sobrevivência larvar do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris***

#### **4.1.1. Introdução**

As larvas de peixes ornamentais marinhos, quando eclodem, possuem um tamanho considerável que lhes permite terem uma maior mobilidade (Olivotto *et al.*, 2011). Em ambiente natural, após o pôr do sol, a eclosão dá-se nas zonas bentónicas onde os ovos são depositados. Após isso, as larvas são atraídas para a superfície do oceano onde estão mais seguras e com maior disponibilidade de alimento (Calado *et al.*, 2017). Durante esta fase pelágica, ocorre uma dispersão no espaço provocada pela natação das larvas e pelo arrastamento que é causado por fortes correntes oceânicas (Geoffrey *et al.*, 2005). Esta dispersão e as grandes quantidades de zooplâncton proporcionam as condições ideais para um rápido crescimento destes indivíduos (Pérez-Domínguez & Holt, 2006). Ainda assim, existem elevadas taxas de mortalidade devido principalmente os danos físicos, à fome e aos predadores.

Em cativeiro, o processo descrito anteriormente acontece de forma diferente, pois o desenvolvimento embrionário ocorre nos tanques dos reprodutores e a produção larvar ocorre em tanques separados. Entre estas duas fases terá que haver o transporte dos ovos ou das larvas para o exterior do tanque dos reprodutores. Existem vários métodos para o fazer e que se dividem em dois grandes grupos: o primeiro consiste em retirar os ovos para o novo local onde vão eclodir e o segundo, em recolher as larvas depois de eclodidas para a larvicultura (Wilkerson, 1998; Olivotto *et al.*, 2011). Existem algumas formas diferentes de proceder e que são referidas em metodologias de alguns estudos com larvas de peixes ornamentais (Gopakumar *et al.*, 2001; Dhaneesh *et al.*, 2012a; Ghosh *et al.*, 2012). Quando se trata do procedimento de deslocar os ovos para outro local, é necessário que estes estejam num substrato móvel, caso contrário será difícil executar o processo sem danificar os ovos. Calado *et al.* (2017) referem que se podem manter os ovos por breves instantes fora de água durante a transferência, mas o mais usual é manter os ovos sempre submersos (Gopakumar *et al.*, 2001; Ignatius *et al.*, 2001). Já no novo local são colocadas pedras difusoras junto à postura, numa intensidade intermédia, para favorecer a oxigenação dos embriões e a agitação

dos ovos. A recolha das larvas junto dos reprodutores é também mencionada em alguns estudos sendo realizada com vários tipos de recipientes de vidro, com camaroeiros e ainda por sifonagem (Gopakumar *et al.*, 2001; Ajithkumar *et al.*, 2012; Dhaneesh *et al.*, 2012a; Calado *et al.*, 2017). É aqui que as larvas, ao serem manipuladas, podem ser sujeitas a alguns fenómenos idênticos aos do meio natural como por exemplo pequenas correntes de água. Na vertente da aquacultura ornamental, muitas vezes não existem protocolos bem definidos para realizar o cultivo, levando ao uso do bom senso ou conhecimentos empíricos para realizar algumas tarefas. Numa maternidade de peixes ornamentais, a forma como as larvas são manipuladas após a nascença pode ter influências ao nível da rentabilidade final de todo o processo. Em primeiro lugar, o tempo despendido na mudança das larvas dos tanques dos reprodutores para a larvicultura é um fator relevante na produtividade de qualquer colaborador numa aquacultura e pode variar de acordo com o procedimento escolhido. Por outro lado, o método utilizado poderá afetar a eficiência da captura e provocar efeitos irreversíveis nos indivíduos recém-nascidos. A falta de estudos em relação a este tema e a necessidade de respostas ao nível empresarial, motivaram a realização deste ensaio onde se estudaram alguns métodos de transferência de larvas de peixe.

Esta investigação teve como objetivo avaliar as diferenças ao nível da sobrevivência larvar utilizando diferentes métodos de captura.

#### 4.1.2. Materiais e Métodos

Para este ensaio foram utilizadas larvas recém eclodidas da espécie *Amphiprion ocellaris*. Após a total eclosão da postura, deu-se início ao procedimento experimental de recolha das larvas. Foram utilizados quatro tratamentos, todos em triplicado, sendo eles: a) sifonagem com tubo de 8 mm; b) sifonagem com tubo de 10 mm; c) sifonagem com tubo de 15 mm; d) captura com camaroeiro (700  $\mu$ m).

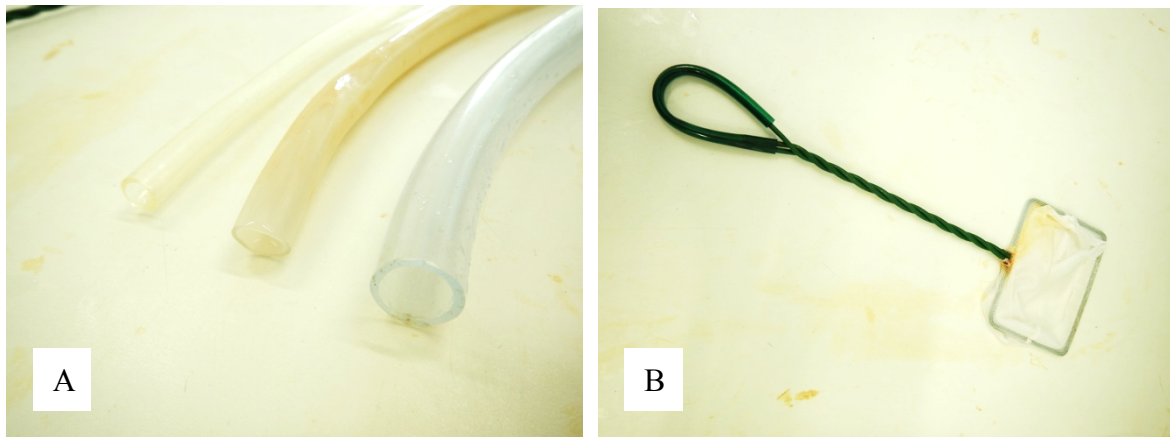


Figura 4.1 – (A) Tubos de 8, 10 e 15 mm utilizados para sifonar larvas; (B) Camaroeiro utilizado para recolha das larvas.

Todos os tubos tinham as mesmas características sendo o diâmetro interno a única diferença entre eles. A captura foi feita de forma aleatória diretamente do aquário dos reprodutores para os aquários de desenvolvimento larvar. Estes últimos tinham 12 litros de capacidade, as laterais forradas a preto e o fundo transparente. Durante o processo, os indivíduos foram registados de modo a obter uma concentração aproximada de 3 larvas por litro. No caso dos tubos, o procedimento foi idêntico para todos eles tendo sido utilizada a altura mínima necessária para ativar a sifonagem durante a apanha. Com o camaroeiro, e de forma a perturbar o mínimo possível, as larvas foram capturadas e transferidas (ainda dentro de água) para um copo, sendo posteriormente colocadas no aquário de cultivo larvar. No fim do processo foi adicionada microalga (*Nannochloropsis oculata*) à água, utilizando o denominado método da água verde na concentração de 3 500 000 células/mL. Os aquários foram mantidos a uma temperatura controlada (26°C) e com arejamento constante.

Ao fim de 12 horas todos os indivíduos, vivos e mortos, foram contabilizados e as taxas de sobrevivência calculadas. Neste sentido, e por forma a comparar os quatro

tratamentos (tubo 8 mm, tubo 10 mm, tubo 15 mm e camaroeiro), realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com um fator. Todos os pressupostos (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Sempre que aplicável, e de modo a comparar os tratamentos entre si, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% (ou seja, sempre que *p-value* <0,05). Sempre que adequado, os resultados são apresentados na forma média±desvio-padrão (DP). Todos os cálculos foram realizados com recurso ao software IBM SPSS Statistics 24.0.

### 4.1.3. Resultados

Para avaliar o efeito dos vários métodos de captura, foi determinada a sobrevivência larvar de peixes-palhaço para cada um deles. Na figura 4.2 estão indicados os resultados obtidos no ensaio.

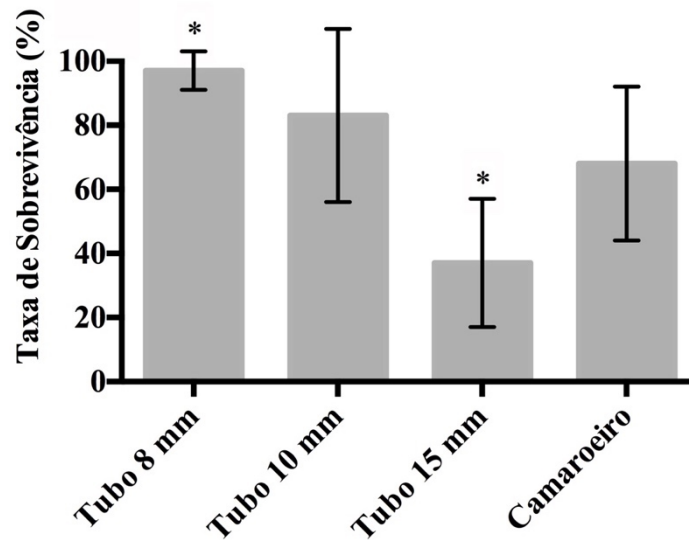


Figura 4.2 - Sobrevivência larvar (média±DP) de *Amphiprion ocellaris* conforme o método de captura. O símbolo \* identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05).

É possível observar que o tubo de 8 mm foi o que obteve uma maior sobrevivência (97±6 %), enquanto o tubo de 15 mm foi onde se observou menor sobrevivência (37±20 %). A taxa de sobrevivência foi de 83±27% e de para 68±24%, para o tubo de 10 mm e para o camaroeiro, respetivamente. No que concerne à comparação entre os quatro métodos, observou-se que apenas existiram diferenças estatisticamente significativas entre os tubos de 8 e de 15 mm (ANOVA, Tukey,  $p$ -value<0,05).

#### 4.1.4. Discussão e Conclusão

O processo de captura das larvas pode ser executado de várias formas sendo que neste trabalho utilizaram-se apenas dois métodos: a sifonagem e a apanha com camaroeiro. A escolha justifica-se pela facilidade e rapidez na execução dos mesmos. Para aprofundar um pouco mais o assunto, foram utilizados três tubos de diâmetros diferentes porque a sifonagem pode variar de acordo com o tubo que é utilizado. É certo que não é só esta característica do tubo que faz variar o efeito de sucção, ainda assim, neste ensaio, foi o único fator de variação entre eles. A utilização do tubo mais estreito (8 mm) foi o que provocou uma maior taxa de sobrevivência larvar mas, quando comparado estatisticamente com os outros métodos, apenas existem diferenças quando é utilizado o tubo mais largo. Alguns autores referem que as larvas de peixes são extremamente sensíveis a turbulências e a variações de natureza física no meio que as rodeia (Wilkerson, 1998; Olivotto *et al.*, 2003). De facto, durante a sifonagem, ocorrem variações no meio porque é gerada alguma turbulência à qual as larvas são sujeitas, nomeadamente uma corrente de água gerada pela sucção da sifonagem. Como as larvas são sugadas e de seguida sujeitas a uma corrente relativamente rápida, pode provocar lesões graves no seu corpo relativamente frágil e levar à sua morte durante as horas que se seguem. É aqui que, dependendo do tubo utilizado, varia a força de sucção, a pressão e a velocidade da água no interior do mesmo (Potter & Barnes, 1971). Estas variações no meio poderão em parte justificar as diferenças de sobrevivência entre os três tubos em estudo. Com estes resultados também é possível observar que é necessário existir uma grande diferença no diâmetro dos tubos para que ocorra uma diferença igualmente relevante ao nível da sobrevivência dos indivíduos, daí ser indiferente utilizar, por exemplo, o tubo de 8 mm ou o de 10 mm.

A utilização do camaroeiro não demonstrou ser diferente ao uso dos tubos. Neste método a agitação provocada no meio é bastante inferior ao anterior podendo ter pouca expressão nos efeitos provocados nas larvas. Embora não existam diferenças estatisticamente significativas quando se compara este método com os outros, ocorreu alguma mortalidade. Por exemplo Wilkerson (1998) refere que, devido à delicadeza das larvas, deve-se evitar o uso de redes no entanto, não existe nenhum estudo que comprove realmente o efeito deste objeto nas larvas de peixe. A mortalidade ocorrida pode estar associada à possibilidade de as larvas ficarem presas na rede durante a captura ou durante a transferência do camaroeiro para o novo local, ficando danificadas. Por outro lado, a prática

do operador também pode ter influência no processo de apanha e transferência causando elevadas mortalidades nas primeiras 24 horas (Calado *et al.*, 2017).

Na realização deste estudo o único fator de variação foi a forma como os indivíduos foram apanhados do aquário dos reprodutores para o aquário da larvicultura. Ainda assim, quando se trabalha com larvas de peixes ornamentais marinhos existem alguns parâmetros que não podemos controlar pois não estão ao nosso alcance. A qualidade da postura, determinada por variadíssimos fatores, é sem dúvida o que mais influencia a sobrevivência das larvas (Calado *et al.*, 2017). Este facto poderá justificar algumas diferenças nas mortalidades entre réplicas do mesmo tratamento, embora a recolha das larvas tenha sido aleatória.

Analisando a questão do ponto de vista empresarial, o tubo de 8 mm ou o de 10mm são os que demonstram melhores resultados ao nível da sobrevivência, praticidade e rapidez de utilização. O emprego do camaroeiro não deixa de ser válido dependendo da finalidade, embora possa requerer mais tempo. Futuramente será interessante perceber a influência de outros fatores como por exemplo o comprimento do tubo, a altura de queda da água e ainda comparar as vantagens/desvantagem destes métodos estudados com o procedimento de retirar os ovos para eclodirem no tanque da larvicultura. Também é importante prolongar a duração destes estudos para analisar se existem diferenças ao nível do crescimento dos indivíduos ou no aparecimento de deformações a longo prazo.

## **4.2. Influência da concentração da “água verde” na sobrevivência e crescimento do peixe-palhaço *Amphiprion frenatus***

### **4.2.1. Introdução**

As microalgas são frequentemente utilizadas em aquacultura para produzir e enriquecer zooplâncton. Fornecem diretamente e indiretamente, a toda a cadeia alimentar, proteínas, ácidos gordos, vitaminas, energia, pigmentos e esteroides (Guedes & Malcata, 2012). Independentemente da finalidade, produzir microalgas é algo dispendioso e requer planeamento para manter um fornecimento em contínuo. Conjugando o tempo de crescimento, as necessidades diárias de uma aquacultura e o requisito de uma boa iluminação, podemos estar a falar da necessidade de uma grande área de cultivo para satisfazer uma produção. Muitas vezes não existe esse espaço disponível e o crescimento de grandes volumes de microalga pode não ser rentável. Existem, no entanto, vários produtos desenvolvidos para superar estes inconvenientes como por exemplo microalga seca, congelada e em pasta. Nas maternidades de peixes ornamentais, para além de ter muita relevância na produção de alimentos vivos, é comumente utilizada para o designado método da água verde. Este método é utilizado porque são obtidos melhores resultados ao nível do crescimento e sobrevivência larvar.

As larvas de muitas espécies de peixes dependem da visão para a deteção das presas e a sua captura depende do tamanho, idade, capacidade natatória e habilidade fisiológica das larvas (Blaxter, 1986). Na fase da produção larvar, a microalga é adicionada juntamente com as presas vivas nos aquários/tanques. É muito comum o uso de *Nannochloropsis oculata* para o método de água verde, ainda assim muitas outras espécies são utilizadas como por exemplo *Tetraselmis* sp., *Chlorella* spp. e *Isochrysis* spp. (Danilowicz & Brown, 1992; Olivotto *et al.*, 2003; Avella *et al.*, 2007). Pensa-se que as microalgas ajudem a manter os níveis de compostos azotados reduzidos e que aumentam o contraste e a visibilidade das presas, pois a visão das larvas ainda não está totalmente desenvolvida (Naas *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 2007). É também alterada a forma como a luz incide na água, ficando mais difusa e menos intensa, aumentando o consumo de zooplâncton pelas larvas (Naas *et al.*, 1992). Parece também haver uma maior agilidade na captura da primeira alimentação se as

microalgas estiverem presentes no meio (Rocha *et al.*, 2008). Ainda ao nível da alimentação, Moffatt (1981) mostrou que o fitoplâncton fornece nutrientes diretamente às larvas e Makridis & Olsen (1999) referem que se mantém a qualidade nutricional do zooplâncton enquanto este não é ingerido. Supõe-se também que ocorrem benefícios ao nível da microflora no recipiente de cultivo e ainda no intestino das larvas (Olsen *et al.*, 2000).

O foco deste estudo foi precisamente a densidade, uma vez que este fator ainda carece de alguma investigação. Protocolos de diversos autores adotam este procedimento em estudos com larvas de peixes ornamentais, no entanto com enormes variações nas densidades utilizadas de *Nannochloropsis oculata*, podendo variar de 50 000 células/mL a 1 500 000 células/mL (Olivotto *et al.*, 2008; Setu *et al.*, 2010; Nass *et al.*, 2016; Calado *et al.*, 2017). Destas todas, as mais referidas acabam por ser as de 50 000 células/mL e 500 000 células/mL. Existem também alguns estudos que se dedicam ao método em questão, mas a maioria deles apenas compara a presença vs ausência de microalga, sendo poucos os que comparam diferentes concentrações. Neste trabalho utilizou-se a concentração de 300 000 células/mL por ser a recomendação mínima do fabricante da microalga e a concentração mais elevada de 3 500 000 células/mL, foi escolhida por ser a utilizada na AQUASPROSEA.

O objetivo deste estudo foi avaliar se ocorrem alterações na produção larvar utilizando diferentes concentrações de microalga no método da água verde.

#### 4.2.2. Materiais e Métodos

Para este ensaio foram utilizadas larvas recém eclodidas da espécie *Amphiprion frenatus*. O procedimento experimental, com a finalidade de testar concentrações do método da água verde, teve início 12 horas após a eclosão das larvas. As larvas recolhidas na noite anterior, foram separadas de forma aleatória, com um copo, para os seis aquários de desenvolvimento larvar. Estes tinham 12 litros de capacidade, as laterais forradas a preto e o fundo transparente (Fig. 4.3). Durante o processo os indivíduos foram contados de modo a obter uma concentração aproximada de 5 larvas por litro. Foram utilizados dois tratamentos, todos em triplicado, sendo eles: a) concentração 300 000 células/mL; b) concentração 3 500 000 células/mL.



Figura 4.3 – Aquários de cultivo larvar utilizados no ensaio.

A espécie de microalga utilizada foi a *Nannochloropsis oculata* (PhytoBloom prof, Necton) e a sua concentração foi verificada e corrigida nos aquários duas vezes por dia. No decorrer da experiência as condições de temperatura, salinidade e fotoperíodo mantiveram-se constantes. Diariamente ocorreu uma troca de água parcial (50%) de forma a manter a melhor qualidade do meio e foram sifonadas as larvas mortas e a sujidade do fundo do aquário. A amónia e os nitritos também foram controlados para garantir que se mantinham próximos de zero. As larvas foram alimentadas com rotíferos enriquecidos (Red Pepper, Bernaqua), que foram mantidos a uma concentração de 10-20 ind./mL. O ensaio teve a duração de 7 dias.

No final do ensaio calculou-se a taxa de sobrevivência e mediu-se o comprimento total (mm) dos sobreviventes por meio de observação à lupa binocular (ZEISS Stemi DV4). No início do ensaio foram também recolhidas aleatoriamente 9 larvas para serem medidos os seus comprimentos totais (mm). Deste modo, e por forma a avaliar a influência dos dois tratamentos (300 000 células/mL e 3 500 000 células/mL) no comprimento (mm) e taxa de sobrevivência dos indivíduos, foi realizado o teste paramétrico de *t-student*. Todos os pressupostos (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% (ou seja, sempre que *p-value* < 0,05). Sempre que adequado, os resultados são apresentados na forma média ± desvio-padrão (DP). Todos os cálculos foram realizados com recurso ao software IBM SPSS Statistics 24.0.

### 4.2.3. Resultados

A taxa de sobrevivência e o comprimento total foram utilizados para avaliar o efeito da densidade de microalgas no cultivo larvar de peixes utilizando o método da “água verde”. Os resultados obtidos estão descritos nas Figuras 4.4 e 4.5.

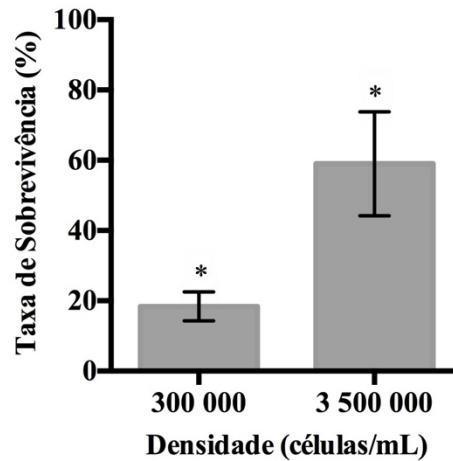


Figura 4.4 - Sobrevivência (média±DP) de *Amphiprion frenatus* sujeitos a duas concentrações do método da “água verde”. O símbolo \* identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05).

A concentração mais elevada (3 500 000 células/mL) de microalga provocou a maior taxa de sobrevivência larvar, isto é, 59,0±14,8 %, enquanto para a concentração de 300 000 células/mL observou-se uma taxa de sobrevivência larvar de 18,4±4,1 %. Adicionalmente, foi possível observar a existência de diferenças estatisticamente significativas, quando comparados ambos os tratamentos ( $t$ -student,  $p$ -value<0,05).

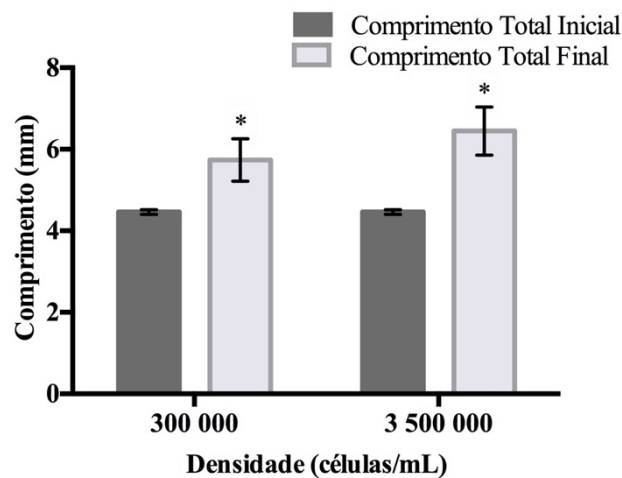


Figura 4.5 – Comprimento total (média±DP) de *Amphiprion frenatus* sujeitos a duas concentrações do método da “água verde”. O símbolo \* identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05).

No início do ensaio, o comprimento médio das larvas era de  $4,46 \pm 0,06$  mm. No fim, para a densidade de 300 000 células/mL o comprimento médio foi  $5,74 \pm 0,52$  mm enquanto que para a densidade de 3 500 000 células/mL foi  $6,45 \pm 0,59$  mm. Os resultados alcançados permitiram observar a existência de diferenças estatisticamente significativas (*t-student*,  $p\text{-value} < 0,05$ ) no comprimento médio dos indivíduos, quando comparados ambos os tratamentos.

#### 4.2.4. Discussão e Conclusão

Na produção de espécies ornamentais marinhas, o método da “água verde” é comumente adotado por apresentar resultados benéficos. A sua aplicação pode variar de acordo com a espécie da microalga ou com a sua concentração. Em larvas de *Amphiprion frenatus*, a adição de diferentes quantidades de microalga teve influências ao nível da sobrevivência e do crescimento. O ensaio terminou com uma maior quantidade de larvas vivas na concentração de 3 500 000 células/mL, e estas apresentaram um tamanho significativamente maior. Existe concordância em ensaios feitos com *Zebrasoma flavescens* (Cirugião Amarelo) pois, nas três concentrações testadas (0 células/mL, 100 000–200 000 células/mL e 400 000–600 000 células/mL), a sobrevivência aumentou quanto mais concentrada estava a microalga (Pereira-Davison & Callan, 2017). Ainda ao nível da sobrevivência, resultados semelhantes são obtidos em estudos com Cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) e Bacalhau (*Gadus morhua*), quando comparada a utilização ou não de água verde (Meeren *et al.*, 2007; Silfrônio *et al.*, 2016). São vários os factos que podem fundamentar os resultados obtidos com as larvas, pois existem evidências que demonstram alterações principalmente ao nível da eficiência alimentar das mesmas. Vários investigadores justificam que o desenvolvimento larvar pode ser influenciado pela água verde porque existe um aumento da incidência da alimentação e por consequência um aumento da ingestão de rotíferos (Carton, 2005; Shaw *et al.*, 2006; Stuart & Drawbridge, 2011; Degidio, 2014). Realmente, um dos benefícios hipotéticos deste método é que a turbidez, provocada pelo fitoplâncton, aumenta o contraste e a visibilidade das presas (Palmer *et al.*, 2007) aumentando assim o consumo de rotíferos. Por outro lado, as melhorias conseguidas na visibilidade das larvas não estão só relacionadas com a água verde, mas também com a intensidade luminosa associada. A variação desta pode influenciar o desempenho da alimentação (Carton, 2005) e por isso é importante encontrar, para cada espécie, a densidade ideal de microalgas conjugada com a melhor intensidade luminosa. Por exemplo, com o Charuteiro-azeite, *Seriola lalandi*, os melhores resultados apareceram com a conjugação da água verde e elevadas intensidades luminosas induzindo um maior consumo de rotíferos em comparação com os outros tratamentos (Stuart & Drawbridge, 2011). Pensa-se ainda que existe uma melhoria direta e indireta na nutrição das larvas devido à ingestão intencional ou não destas algas ou então por se manterem as presas vivas enriquecidas até serem consumidas (Moffatt, 1981; Palmer *et al.*, 2007). Noutra perspetiva, também é dito

por Hjelmeland *et al.* (1988) que a presença de algas no intestino aumenta e estimula a presença de enzimas benéficas à digestão das presas.

Os resultados deste trabalho demonstraram também diferenças no crescimento larvar quando comparadas as duas concentrações. De acordo com as evidências explicadas anteriormente, parecem estar explicados os motivos do maior crescimento na maior concentração devido principalmente à maior eficiência alimentar. Em larvas de solha-verde (*Rhombosolea tapirina*), Shaw *et al.* (2006) também obtiveram diferenças no crescimento, sendo significativamente maior quando utilizada a água verde. Resultados contrários foram obtidos por Meeren *et al.* (2007), em larvas de bacalhau, em que a taxa de crescimento não se alterou com a turbidez da água. Posto isto, é importante ter em conta que o crescimento e a sobrevivência das larvas pode variar de espécie para espécie e depende também do tamanho e idade das larvas (Shaw *et al.*, 2006). Por este motivo apenas será mais correto comparar os resultados com dados da mesma espécie, justificando-se a necessidade de mais estudos.

Outras causas são apontadas como impulsionadoras da sobrevivência e crescimento larvar como por exemplo a redução do stress das larvas e do risco de predação (Palmer *et al.*, 2007). Isto pode ser motivado pela atenuação e dispersão da luz causado pelas microalgas e ainda pelas paredes dos aquários escurecidas. A redução dos compostos azotados da água e o aumento da concentração de oxigénio são outras hipóteses apontadas como benéficas para as larvas (Palmer *et al.*, 2007), no entanto carecem de evidências científicas que comprovem estes efeitos. Papandroulakis *et al.* (2001) ainda referem que a não utilização do método da água verde, para além das elevadas mortalidades, provoca deformações ao nível esquelético devido à ausência de bexiga natatória e ainda um crescimento desigual dos indivíduos que leva ao canibalismo durante fases mais avançadas. Também é importante não esquecer que, ao nível empresarial, o fornecimento de uma quantidade de fitoplâncton inadequada pode resultar por exemplo, num aumento de custos de produção por utilização excessiva ou numa diminuição da produção larvar por défice ou excesso de microalga. Posto isto é fundamental apurar estes aspetos em protocolos de produção larvar para reduzir a mortalidade das larvas e aumentar as suas taxas de crescimento.

Pode-se concluir que concentrações mais elevadas de microalgas, nos tanques de cultivo larvar, são benéficas a vários níveis aumentando a sobrevivência e o crescimento das

larvas. Os resultados obtidos para esta espécie podem ser diferentes para outras havendo assim a necessidade de mais estudos sobre o efeito da turbidez da água na área da larvicultura ornamental marinha. Como foi dito anteriormente, a intensidade luminosa é bastante importante quando conjugada com a água verde devendo ser estudados em conjunto. Também será interessante testar outras concentrações de forma a comparar com estas já testadas, concluindo qual será a mais benéfica. O estudo das densidades deverá ser levado até se descobrir em que ponto a turbidez muito elevada prejudica as larvas de peixe. Existem ainda outras espécies de microalgas que carecem de investigação, porque não se sabe que efeitos podem provocar na criação de larvas. Outros fatores como o tamanho e cor do tanque, a qualidade do alimento e a densidade das presas não devem ser esquecidos neste tipo de trabalhos.

### **4.3. Influência do desmame na sobrevivência e crescimento de juvenis do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris***

#### **4.3.1. Introdução**

A nutrição animal é um fator chave no sucesso de qualquer aquacultura, principalmente nas fases de vida mais prematuras. Um dos grandes entraves na produção larvar de peixes ornamentais marinhos é a primeira alimentação, devido à pequena abertura da boca das larvas e ao sistema digestivo pouco desenvolvido (Holt, 2003; Rønnestad *et al.*, 2003). Nesta área, ainda existe uma grande dependência de presas vivas com tamanhos adequados e com um ótimo perfil nutricional (Bengtson, 2003). O facto do intestino das larvas ainda não conseguir decompor na totalidade os alimentos, leva a que as enzimas presentes no alimento vivo sejam benéficas para uma melhor digestão (Kolkovski *et al.*, 1993). É muito comum, nos primeiros dias de vida, recorrer-se aos rotíferos (*Brachionus* spp.) como primeiro alimento, seguido de náuplios e metanáuplios de *Artémia* sp. (Battaglione & Fielder, 1997; Wullur *et al.*, 2009). Com o passar do tempo os peixes ganham dimensões cada vez maiores e por isso requerem também alimentos adequados ao seu tamanho. A modificação dos alimentos fornecidos de acordo com o crescimento é de extrema importância para o correto desenvolvimento das larvas. Se a energia gasta para capturar partículas muito pequenas não for excedida pela energia do próprio alimento, poderá haver um atraso no desenvolvimento das larvas. A eficácia da utilização dos alimentos, pelos indivíduos, também pode estar relacionada com outros aspetos tais como: fatores visuais (cor, forma, tamanho e movimento), fatores químicos (ex. “cheiro”), composição do alimento, ingestão, digestão e absorção (Kolkovski *et al.*, 2009). Todos estes parâmetros devem ser considerados na alimentação de qualquer peixe, independentemente da sua fase de vida, tendo em conta o tipo de alimento (vivo ou inerte) e de acordo com as espécies em específico.

O procedimento mais comum em qualquer exploração é o fornecimento de alguns tipos de zooplâncton vivo durante os primeiros tempos de vida das larvas. Depois, é feito o processo de desmame que varia muito de empresa para empresa (Jeannine *et al.*, 1993), isto porque este tipo de protocolos ainda não estão devidamente otimizados. Neste processo inicia-se o fornecimento de rações de forma muito gradual e reduz-se igualmente a

quantidade de alimento vivo. O objetivo final é que os indivíduos apenas consumam ração, eliminando por completo a dependência do zooplâncton vivo.

Tendo em conta os elevados custos associados à produção de alimentos vivos, as dietas inertes têm cada vez mais interesse devido à simples manipulação nutricional, ao baixo custo de produção e à conveniência de utilização (Moorhead & Zeng, 2010). Em contrapartida, as micropartículas destas dietas são pouco atraentes como “presas”, têm reduzida estabilidade na água, exibindo pouca flutuabilidade e tempo de permanência na coluna de água e ainda contribuem pouco para a atividade enzimática no intestino das larvas (Langdon *et al.*, 2007). Até a data, o uso de presas vivas é vital para o desenvolvimento de larvas de peixes ornamentais marinhos. É muito raro obter-se um elevado sucesso, com estes animais, quando se tenta fornecer apenas alimentos inertes desde a eclosão. Apenas existe a exceção de algumas espécies de água doce em que as larvas possuem um tamanho considerável, após a eclosão, para se adaptarem facilmente às rações (Jones *et al.*, 1993). Uma vez que ainda é muito difícil produzir larvas exclusivamente com ração, a aceitação deste tipo de alimento pode depender muito da idade dos indivíduos. À escala industrial, é importante perceber qual o melhor momento para introduzir o alimento inerte, aumentando a rentabilidade sem comprometer o bem-estar animal.

O objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças no desenvolvimento de peixes-palhaço juvenis após o desmame aos 14 dias de idade.

### 4.3.2. Materiais e Métodos

Para este ensaio foram utilizados peixes juvenis da espécie *Amphiprion ocellaris*. Estes indivíduos tinham 14 dias de idade quando foram capturados aleatoriamente para os aquários do ensaio. Cada aquário, com 4 litros de capacidade, foi preenchido com 25 peixes juvenis. Foram utilizados dois tratamentos, todos em triplicado, sendo eles: a) alimentação com metanúplios de artémia (controlo); b) alimentação com ração.

Os peixes do controlo foram alimentados com *Artemia* sp. enriquecida (Red Pepper, Bernaqua), numa concentração de 1-2 metanúplios/mL, dando-se continuidade à dieta fornecida antes do ensaio começar. Os indivíduos do segundo tratamento foram alimentados com ração (Caviar, Bernaqua) de tamanho 300-500  $\mu\text{m}$ , 3 vezes ao dia até à saciedade (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Esquema de alimentação diária fornecida no decorrer do ensaio.

Tratamento	Frequência alimentação	Quantidade fornecida
Metanúplios Artémia	3 vezes por dia	1-2 metanúplios/mL
Ração (300-500 $\mu\text{m}$ )	3 vezes por dia	Até à saciedade

Os peixes deste tratamento foram previamente desmamados com uma mistura de artémia enriquecida e ração, durante os 3 dias anteriores ao começo da experiência. As condições de temperatura, salinidade e fotoperíodo mantiveram-se constantes durante toda a experiência. Diariamente ocorreu uma troca de água, gota-a-gota, equivalente a três vezes o volume de cada aquário, de forma a manter a melhor qualidade do meio. A amónia e os nitritos também foram controlados para garantir que se mantinham próximos de zero. O ensaio teve a duração de 15 dias.

No final do ensaio todos os indivíduos vivos foram anestesiados, contados, medidos os seus comprimentos totais (mm) à lupa binocular (ZEISS Stemi DV4) e pesados (OHAUS Adventurer). No início do ensaio foram também recolhidos aleatoriamente 15 juvenis para

serem medidos (comprimento total) e pesados. Por forma a avaliar o efeito dos dois tratamentos (controlo e ração) na taxa de sobrevivência, no comprimento total (mm) e no peso (mg) realizou-se o teste paramétrico de *t-student*. Todos os pressupostos (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% (ou seja, sempre que *p-value* <0,05). Sempre que adequado, os resultados são apresentados na forma média±desvio-padrão (DP). Todos os cálculos foram realizados com recurso ao software IBM SPSS Statistics 24.0.

### 4.3.3. Resultados

Nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8 estão apresentados os resultados obtidos neste estudo com juvenis de peixe-palhaço. Foi avaliada a sobrevivência, o peso (mg) e o comprimento (mm).

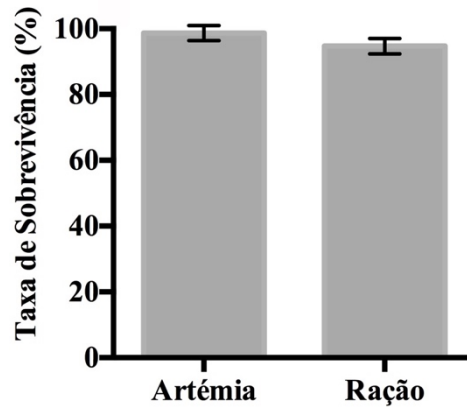


Figura 4.6 – Sobrevivência (média±DP) de *Amphiprion ocellaris* alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controle).

No decorrer do ensaio, a taxa de sobrevivência do controle foi de 98,7±2,3 %, enquanto para a ração foi de 94,7±2,3 %. Pelos resultados obtidos, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (*t-student*, *p-value*>0,05) no caso da sobrevivência dos indivíduos.

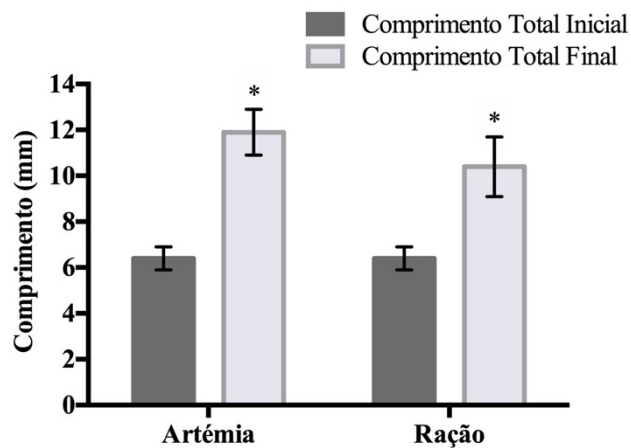


Figura 4.7 – Comprimento total (média±DP) de *Amphiprion ocellaris* alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controle). O símbolo \* identifica as diferenças estatisticamente significativas (*p-value*<0,05).

No início, o comprimento médio das larvas era  $6,4 \pm 0,5$  mm e o peso médio  $5,1 \pm 0,6$  mg. O comprimento total final foi  $11,9 \pm 1,0$  mm e  $10,4 \pm 1,3$  mm para o tratamento de controlo e ração, respetivamente. Os resultados obtidos permitiram observar a existência de diferenças estatisticamente significativas (*t-student*,  $p\text{-value} < 0,05$ ) para o crescimento, quando comparados os dois tratamentos.

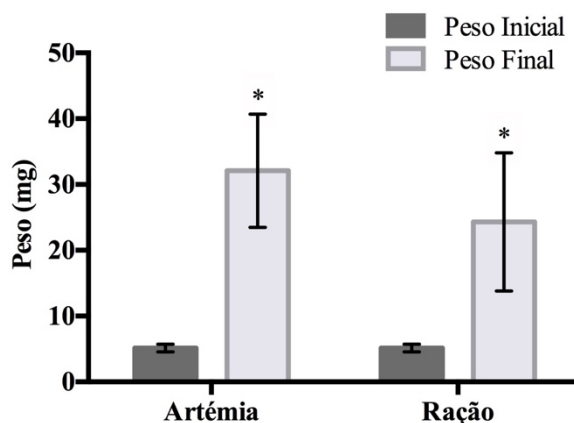


Figura 4.8 – Peso (média $\pm$ DP) de *Amphiprion ocellaris* alimentados com ração (após desmame) ou presas vivas (controlo). O símbolo \* identifica as diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Em relação aos pesos finais também existiram diferenças estatisticamente significativas (*t-student*,  $p\text{-value} < 0,05$ ), terminando o controlo com um peso médio mais elevado de  $32,1 \pm 8,6$  mg. Os indivíduos alimentados só com ração terminaram o ensaio com  $24,3 \pm 10,5$  mg de peso médio.

#### 4.3.4. Discussão e Conclusão

Para se conseguir criar peixes com ótimas taxas de crescimento e com reduzidas mortalidades é necessário dominar todos os fatores determinantes destas variações. A alimentação é com certeza um dos pontos chave para que tal ocorra e por isso deve ser melhorada tanto quanto possível, principalmente no momento de transição do alimento vivo para as rações. Como a idade do desmame é um ponto importante na produção, avaliaram-se os efeitos provocados em peixes quando o mesmo ocorreu aos 14 dias após a eclosão. Esta escolha deve-se, em parte, aos resultados obtidos num estudo idêntico realizado por Gordon *et al.* (2000) e também aos procedimentos realizados na empresa. Neste estudo, os peixes alimentados exclusivamente com artémia até um mês de idade demonstraram melhores resultados no crescimento. Aparentemente tiveram um aumento significativamente superior, no comprimento total e no peso, comparando com os indivíduos alimentados exclusivamente com ração após o décimo quarto dia de vida. Estes resultados não são concordantes com um estudo idêntico, em juvenis de *Amphiprion percula*, onde não se encontraram diferenças estatisticamente significativas no peso e no comprimento total dos indivíduos (Gordon *et al.*, 2000). Comparando os resultados, parece existir um crescimento muito desigual dos indivíduos no ensaio de Gordon *et al.* (2000) podendo ser um dos motivos pelo qual não se detetaram alterações. Já no caso do crescimento de peixes dourados (*Carassius auratus*), alimentados exclusivamente com alimentos secos, detetou-se uma redução significativa comparando com uma dieta à base de artémia (Abi-Ayad & Kestemont, 1994).

O menor desenvolvimento dos peixes alimentados com ração é justificado por muitos autores pelo facto de o intestino das larvas ainda não ser totalmente funcional, não conseguindo digerir de forma eficiente este tipo de alimentação (Kim *et al.*, 2001; Kolkovski, 2001; Rønnestad *et al.*, 2007). Isto deve-se ao reduzido nível de atividade enzimática dos intestinos e do pâncreas das larvas nas fases mais precoces da alimentação (Cousin *et al.*, 1987; Holt, 1993). A vantagem que os alimentos vivos têm, é a presença das suas próprias enzimas que ajudam na digestão (Kolkovski, 2001). Também é dito por este autor que o efeito destas enzimas na alimentação pode variar conforme os hábitos alimentares, a idade dos indivíduos e o tipo de enzimas. No caso das rações, para além de não conterem esta componente enzimática, possuem na sua constituição ingredientes, como por exemplo proteínas, que são de difícil digestão. Jeannine *et al.* (1993) explicam que

através da análise do conteúdo intestinal de larvas é possível perceber a incompleta digestão das dietas inertes antes da excreção. As taxas de ingestão podem também prejudicar o desenvolvimento devido principalmente à atratividade do alimento. Este deve estimular as larvas para que seja ingerido em quantidades suficientes de forma a superar os requisitos nutricionais dos indivíduos (Jeannine *et al.*, 1993). A artémia, em comparação com a ração, tem mobilidade na coluna de água estimulando o comportamento de predação por parte das larvas. Para além disso, o alimento vivo não se degrada tão rapidamente após o fornecimento, permitindo uma alimentação mais prolongada. Uma das desvantagens no fornecimento de ração é a sua rápida decomposição, nos minutos que se seguem, perdendo o interesse de ingestão. Também é importante adaptar as características da ração ao método de alimentação, ao tipo de tanque e à turbulência da água para garantir a possibilidade dos peixes capturarem o alimento (Jeannine *et al.*, 1993; Cahu & Zambonino Infante, 2001).

A nutrição destes animais nestas fases de vida pode ficar comprometida se não forem conhecidos os requisitos da espécie em questão e se a alimentação não for adaptada a isso. No caso da ração, a granulometria deve ser adequada ao tamanho da boca das larvas (Cahu & Zambonino Infante, 2001) e deve conter os elementos necessários para ser atrativa. Estudos histológicos ao sistema digestivo de *Amphiprion percula* indicam que, após a eclosão, já se encontra num estado de desenvolvimento avançado em comparação com outras espécies, sugerindo que a transição para alimentos inertes pode ocorrer a partir dos 9 dias após a eclosão (Gordon & Hecht, 2002; Önal *et al.*, 2008). A sobrevivência pode também ser afetada se a combinação de todos os fatores mencionados anteriormente com os indivíduos não for a ideal. Neste estudo, a sobrevivência dos peixe-palhaço não revelou diferenças entre os tratamentos. Resultado idêntico foi obtido por Gordon *et al.* (2000) em peixes desmamados aos 15 dias após a eclosão. Isto sugere que, a transição para alimentos inertes nestas idades, não influencia de todo a mortalidade. Apesar destes resultados, o crescimento foi significativamente inferior nos indivíduos alimentados com ração o que sugere a procura de outras respostas para contrariar este efeito. O método da co-alimentação é referenciado como uma possível alternativa à redução da quantidade de presas vivas, pois é utilizada em conjunto com a ração (Rosenlund *et al.*, 1997; Kolkovski, 2001). Mesmo assim ainda não são bem explícitos quais os efeitos na criação de peixes ornamentais marinhos sendo necessário mais estudos.

Para concluir, esta experiência mostrou que, efetuando o desmame aos 14 dias, as dietas inertes ainda não provocam um desenvolvimento tão acelerado em *Amphiprion ocellaris* em comparação com os alimentos vivos. Por outro lado, não causa qualquer perturbação ao nível da sobrevivência. Será interessante dar continuidade a este tipo de ensaios, testando outras alturas do começo do desmame, para se descobrir qual a melhor fase para realizar o desmame e verificar se com o tempo estas diferenças se mantêm ou não. Estes aspetos devem ainda ser correlacionados com uma possível evolução das rações, como por exemplo a incorporação de enzimas.



## 5. Conclusão

A oportunidade de realização de um estágio no âmbito do mestrado em aquacultura, na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar em Peniche, proporciona uma visão alargada de todos os conhecimentos adquiridos em contexto académico. É possível utilizar toda a aprendizagem de forma prática no contexto empresarial, aumentando a experiência e os conhecimentos num ponto de vista completamente diferente da “sala de aula”.

O estágio na AQUASPROSEA foi muito enriquecedor pois houve a assimilação de novos conhecimentos na área da aquacultura ornamental marinha. Foi desenvolvido trabalho com diversas espécies de peixes, mais concretamente todo o processo desde os reprodutores, cultivo larvar, pré engorda e engorda dos indivíduos para posterior venda. Tal como foi descrito, são muitas as tarefas e rotinas desempenhadas numa unidade de aquacultura deste tipo, sendo uma mais valia para o desenvolvimento de qualquer pessoa ao nível profissional e pessoal.

Como suplemento do estágio, ainda foi possível desenvolver algum trabalho de investigação nesta área, contribuindo para o aumento do conhecimento científico geral, pessoal e da empresa. Em primeiro lugar deu-se início ao estudo comparativo dos métodos de captura de larvas recém eclodidas, algo nunca antes testado. Embora ainda exista muito trabalho pela frente, concluiu-se que a sifonagem com o tubo de 8 mm ou 10 mm é vantajosa sendo que o camaroeiro também pode ser utilizado. De seguida, no ensaio do método da “água verde”, comprovou-se que a concentração utilizada na empresa (3 500 000 células/mL) provoca menos mortalidade e maior crescimento das larvas em comparação com concentrações mais reduzidas. Por fim, o desmame de juvenis de peixe-palhaço aos 14 dias de idade não provoca alterações na sobrevivência embora com um crescimento mais reduzido em comparação com o uso de artémia. Todos estes assuntos são importantes, principalmente na vertente empresarial, pois permitem melhorar protocolos e aumentar a produtividade embora muitos deles ainda careçam de mais estudos.

Desta forma concluíram-se todos os objetivos propostos ao nível do estágio e da componente de investigação. Foi uma mais valia para o desenvolvimento cognitivo pessoal por tudo o que já foi explicado, da comunidade científica e da empresa principalmente o estudo de assuntos relacionados com a mesma.



## 6. Referências Bibliográficas

- Abi-Ayad, A. & Kestemont, P. 1994. Comparison of the nutritional status of goldfish (*Carassius auratus*) larvae fed with live, mixed or dry diet. *Aquaculture*, 128, 163-176.
- Ajithkumar, T., Mohan, G., Kv, D., Vinoth, R., Ghosh, S., Thangavel, B. & Shunmugaraj, T. 2012. Hatchery production of the clownfish *Amphiprion nigripes* at Agatti Island, Lakshadweep, India. *Journal of Environmental Biology*, 33, 623-8.
- Avella, M., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F. & Carnevali, O. 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 273, 87-95.
- Battaglione, S. & Fielder, S. 1997. The status of marine fish larval-rearing technology in Australia. *Hydrobiologia*, 358, 1-5.
- Bengtson, D. A. 2003. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present, future. Live feeds in marine aquaculture.: *Blackwell Science, Oxford*.
- Blaxter, J. H. S. 1986. Development of sense organs and behaviour of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115, 98-114.
- Brons, R. 1996. Reproduction and captive breeding of two Red Sea dottybacks: *Pseudochromis fridmani* and *P. flavivertex*. *Freshwater and Marine Aquarium*, 19, 48-62.
- Bryant, D., Burke, L., Mcmanus, J. & Spalding, M. 1998. Reefs at Risk: A Map-Based Indicator of Threats to the World's Coral Reefs, *World Resources Institute. N.Y.*
- Cahu, C. & Zambonino Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200, 161-180.
- Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M. & Holt, G. 2017. Marine ornamental Species Aquaculture, *Wiley Blackwell*.
- Carton, A. G. 2005. The impact of light intensity and algal-induced turbidity on first-feeding *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture Research*, 36, 1588-1594.
- Cheng, S.-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.
- Cortes, G. & Tsuzuki, M. 2011. Effect of different live food on survival and growth of first feeding barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997) larvae. *Aquaculture Research*, 43.

- Côrtes, G. D. F. & Tsuzuki, M. N. Y. 2010. Efeito do tamanho do rotífero na sobrevivência e no crescimento de Neon Gobi *Elacatinus figaro* durante as fases iniciais de larvicultura. *Boletim do Instituto Pesca*, 36(3), 205 – 212.
- Cousin, J. C. B., Baudin-Laurencin, F. & Gabaudan, J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, 30, 15-33.
- Danilowicz, B. & Brown, C. 1992. Rearing methods for two damselfish species: *Dascyllus albisella* (Gill) and *D. aruanus* (L.). *Aquaculture*, 106, 141-149.
- Degidio, J. M. L. 2014. Assessment of the Milletseed Butterflyfish, *Chaetodon miliaris*, as a Model Species for Marine Ornamental Aquaculture and an Evaluation of Early Culture Parameters, *University of Florida*.
- Delbare, D., Lavens, P. & Sorgeloos, P. 1995. Clownfish as a reference model for nutritional experiments and determination of egg/larval quality. *European Aquaculture Society*, 24.
- Demeke, A. & Tassew, A. 2016. A review on water quality and its impact on Fish health. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 3, 21-31.
- Dhaneesh, K. V., Ajithkumar, T., Divya, S., Kumaresan, S. & Thangavel, B. 2012a. Influence of prompt first feeding on growth and survival of Clownfish *Amphiprion percula* larvae. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 92-97.
- Dhaneesh, K. V., Nanthini Devi, K., Ajith Kumar, T. T., Balasubramanian, T. & Tissera, K. 2012b. Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *Journal of King Saud University - Science*, 24, 201-209.
- Domínguez, L. M. & Botella, Á. S. 2014. An overview of marine ornamental fish breeding as a potential support to the aquarium trade and to the conservation of natural fish populations. *International Journal of Sustainable Development and Planning*, 9, 608-632.
- Froese, R. & D., P. 2013. *FishBase, World Wide Web electronic publication* [Online]. [Accessed 2018].
- Froese, R. & Pauly, D. 2014. *Species of Amphiprion*. [Online]. [Accessed 2018].
- Geoffrey, J., Serge, P. & Simon, T. 2005. Coral Reef Fish Larvae Settle Close to Home. *Current Biology*, 15, 1314-1318.
- Ghosh, S., Ajithkumar, T., Nanthinidevi, K. & Thangavel, B. 2012. Reef fish Breeding and Hatchery Production Using Brackishwater, A Sustainable Technology with Special Reference to Clark's Clownfish, *Amphiprion Clarkii* (Bennett, 1830). *International Journal of Environmental Science and Development*, 56-60.
- Gopakumar, G. 2006. Culture of Marine Ornamental Fishes with reference to Production Systems, Feeding and Nutrition. *International Seminar on Ornamental Fish Breeding, Farming and Trade*, 5-6.

- Gopakumar, G., Creorge, R. M. & Jasmine, S. 2001. Hatchery production of the clownfish *Amphiprion chrysogaster*. *Central Marine Fisheries Research Institute, Cochi*.
- Gordon, A. & Hecht, T. 2002. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 113-117.
- Gordon, A. K., Kaiser, H., Britz, P. J. & Hecht, T. 2000. Effect of Feed Type and Age-at-weaning on Growth and Survival of Clownfish *Amphiprion percula* (Pomacentridae). *Aquarium Sciences and Conservation*, 2, 215-226.
- Green, B. S. & McCormick, M. I. 2005. O<sub>2</sub> replenishment to fish nests: males adjust brood care to ambient conditions and brood development. *Behavioral Ecology*, 16, 389-397.
- Green, E. 2003. International Trade in Marine Aquarium Species: Using the Global Marine Aquarium Database. Marine Ornamental Species. *Blackwell Publishing Company*.
- Guedes, A. C. & Malcata, F. X. 2012. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. Aquaculture Zainal Muchlisin. *IntechOpen*.
- Hadfield, C. A. & Clayton, L. A. 2011. Fish quarantine: current practices in public zoos and aquaria. *J Zoo Wildl Med*, 42, 641-50.
- Herler, J., Munday, P. & Hernaman, V. 2011. Gobies on Coral Reefs. The biology of gobies. *Science Publishers*.
- Hjelmeland, K., Pedersen, B. H. & Nilssen, E. M. 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. *Marine Biology*, 98, 331-335.
- Holt, G. J. 1993. Feeding Larval Red Drum on Microparticulate Diets in a Closed Recirculating Water System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 225-230.
- Holt, G. J. 2003. Research on culturing the early life stages of marine ornamental fish. Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation. *Ames, Iowa: Iowa State Press*.
- Holt, G. J. 2011. Larval Fish Nutrition, *Wiley-Blackwell*.
- Ignatius, B., Rathore, G., Jagadis, I., Kan-Dasami, D. & C C Victor, A. 2001. Spawning and larval rearing technique for tropical clown fish *Amphiprion sebae* under captive condition. *Journal of Agriculture in Tropics*, 16, 241-249.
- Jeannine, P. L. R., Claude, A. J., Laurence, T. & Chantal, M. 1993. Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey? *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 211-224.
- Jones, D. A., Kamarudin, M. S. & Le Vay, L. 1993. The Potential for Replacement of Live Feeds in Larval Culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 199-210.

- Kim, B. G., Divakaran, S., Brown, C. L. & Ostrowski, A. C. 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 225-241.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200, 181-201.
- Kolkovski, S., Lazo, J., Leclercq, D. & Izquierdo, M. 2009. Fish larvae nutrition and diet: new developments. New Technologies in Aquaculture. *Woodhead Publishing*.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W. & Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12, 203-209.
- Landau, M. 1992. Introduction to Aquaculture, *John Wiley & Sons, Inc, New York*.
- Langdon, C., Clack, B. & Önal, U. 2007. Complex microparticles for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae. *Aquaculture*, 268, 143-148.
- Leal, M. C., Vaz, M. C. M., Puga, J., Rocha, R. J. M., Brown, C., Rosa, R. & Calado, R. 2016. Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. *Fish and Fisheries*, 17, 459-468.
- Lei, F. & Poulin, R. 2011. Effects of salinity on multiplication and transmission of an intertidal trematode parasite. *Marine Biology*, 158, 995-1003.
- Lim, C. L., Dhert, P. & Sorgeloos, P. 2003. Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture*, 227, 319-331.
- Lubbock, H. R. & Polunin, N. V. C. 1975. Conservation and the Tropical Marine Aquarium Trade. *Environmental Conservation*, 2, 229-232.
- Madhu, K., Madhu, R. & Retheesh, T. 2016. Spawning, embryonic development and larval culture of redhead dottyback *Pseudochromis dilectus* Lubbock, 1976 under captivity. *Aquaculture*, 459, 73-83.
- Madhu, K., Rema, M., L., K., C., S. S. & K., M. V. 2006. Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. *Marine Fisheries Information Service*, 188, 1-5.
- Madhu, R., Madhu, K. & Retheesh, T. 2012. Life history pathways in false clown *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830: A journey from egg to adult under captive condition. *Journal of Marine Biological Association of India*, 54, 77-90.
- Madhu, R., Madhu, K. & Retheesh, T. 2013. Breeding and seed production of Clown fishes under captivity., 201-208.

- Makridis, P. & Olsen, Y. 1999. Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation. *Aquaculture*, 174, 343-353.
- Meeren, T. V. D., Mangor-Jensen, A. & Pickova, J. 2007. The effect of green water and light intensity on survival, growth and lipid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*) during intensive larval rearing. *Aquaculture*, 265, 206-217.
- Meirelles, M., Tsuzuki, M., Furtado Ribeiro, F., Cassula Medeiros, R. & Diniz Silva, I. 2009. Reproduction, early development and larviculture of the barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997). *Aquaculture Research*, 41, 11-18.
- Mies, M., Güth, A., S Scozzafave, M. & Sumida, P. 2014. Spawning behaviour and activity in seven species of ornamental dottybacks. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 2, 117-122.
- Moe, M. 2008. Culture of Marine Ornamentals: For Love, for Money, and for Science. Marine Ornamental Species: Collection, Culture & Conservation. Arnes, AI, United States: *Wiley*.
- Moffatt, N. M. 1981. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom. *Rapport Procedures Réunion du Conseil internationale de Exploration de la Mer* 178, 475-480.
- Mooi, R. D. 1990. Egg Surface Morphology of Pseudochromoids (Perciformes: Percoidei), with Comments on Its Phylogenetic Implications. *Copeia*, 1990, 455.
- Moorhead, J. & Zeng, C. 2010. Development of Captive Breeding Techniques for Marine Ornamental Fish: A Review. *Reviews in Fisheries Science*, 18, 315-343.
- Murray, J. M., Watson, G. J., Giangrande, A., Licciano, M. & Bentley, M. G. 2012. Managing the Marine Aquarium Trade: Revealing the Data Gaps Using Ornamental Polychaetes. *Plos One*, 7, e29543.
- Naas, K. E., Nilsen, T. & Harboe, T. 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, 105, 143-156.
- Nass, D. H., Gonçalves, E. L. T. & Tsuzuki, M. Y. 2016. Effect of live food transition time on survival, growth and metamorphosis of yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*, larvae. *Aquaculture International*, 24, 1255-1261.
- Nijman, V. 2009. An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation*, 19, 1101-1114.
- O'sullivan, D. 2008. The Australian ornamental fish industry in 2006/07, *Fisheries Research and Development Corporation: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry: Dosaqua Pty Ltd: EconSearch Pty Ltd*.
- Oata 2017. EU Ornamental Fish Import & Export Statistics 2016 (Third Countries & Intra-EU Community trade). In: LTD., O. A. T. A. (ed.).

- Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C. C., Malzone, M. G. & Carnevali, O. 2008. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture*, 284, 211-216.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, F. & Carnevali, O. 2003. Coral reef fish breeding: the secrets of each species. *Aquaculture*, 224, 69-78.
- Olivotto, I., Chemello, G., Vargas, A., Randazzo, B., Piccinetti, C. C. & Carnevali, O. 2017. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 116-121.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M. A. & Calado, R. 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 135-166.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L. & Carnevali, O. 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture*, 255, 480-487.
- 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.
- Olsen, A. I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T. H., Skjermo, J. & Vadstein, O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 190, 11-25.
- Önal, U., Langdon, C. & Çelik, I. 2008. Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacépède 1802): a histological perspective. *Aquaculture Research*, 39, 1077-1086.
- Palmer, P. J., Burke, M. J., Palmer, C. J. & Burke, J. B. 2007. Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere. *Aquaculture*, 272, 1-21.
- Palmtag, M. & Holt, G. J. 2001. Spawning and rearing of the fire shrimp (*Lyssmata debelius*) in captivity. *Aquaculture 2001: Book of Abstracts*, 512.
- Papandroulakis, N., Divanach, P., Anastasiadis, P. & Kentouri, M. 2001. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture International*, 9, 205-216.
- Pedrazzani, A., Kim Pham, N., Lin, J. & Ostrensky, A. 2014. Reproductive behavior, embryonic and early larval development of the red head goby, *Elacatinus puncticulatus*. *Anim Reprod Sci.*, 145, 69-74.
- Pereira-Davison, E. & Callan, C. K. 2017. Effects of photoperiod, light intensity, turbidity and prey density on feed incidence and survival in first feeding yellow tang (*Zebrasoma flavescens*)(Bennett). *Aquaculture Research*, 49, 890-899.

- Pérez-Domínguez, R. & Holt, G. J. 2006. Interrenal and thyroid development in red drum (*Sciaenops ocellatus*): effects of nursery environment on larval growth and cortisol concentration during settlement. *General and comparative endocrinology*, 146, 108-118.
- Potter, A. & Barnes, F. H. 1971. The siphon. *Physics Education*, 6, 362.
- Rhyne, A. L., Tlusty, M. F. & Kaufman, L. 2012a. Long-term trends of coral imports into the United States indicate future opportunities for ecosystem and societal benefits. *Conservation Letters*, 5, 478-485.
- Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Schofield, P. J., Kaufman, L., Morris, J. A., Jr. & Bruckner, A. W. 2012b. Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. *Plos One*, 7, e35808.
- Rocha, R., Ribeiro, L., Costa, R. & Dinis, M. 2008. Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? *Aquaculture Research*, 39, 362-369.
- Rønnestad, I., Kamisaka, Y., Conceição, L. E. C., Morais, S. & Tonheim, S. K. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture*, 268, 82-97.
- Rønnestad, I., Tonheim, S. K., Fyhn, H. J., Rojas, G., X, A, C. R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R. N., Terjesen, B. F., Barr, Y. & Conceição, L. E. C. 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture*, 227, 147-164.
- Rosenlund, G., Stoss, J. & Talbot, C. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture*, 155, 183-191.
- Rubec, P. J. 1988. The need for conservation and management of Philippine coral reefs. *Environmental Biology of Fishes*, 23, 141-154.
- Sargent, J., Mcevoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179, 217-229.
- Sargent, J. R., Mcevoy, L. A. & Bell, J. G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155, 117-127.
- Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R. W. & Sloman, K. A. 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science*, 125, 195-205.
- Setu, S., Ajithkumar, T., Thangavel, B., R Dabbagh, A. & Keshavarz, M. 2010. Breeding and Rearing of Regal Damselfish *Neopomacentrus cyanomos* (Bleeker, 1856): The Role of Green Water in Larval Survival. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2, 551-557.

- Shaw, G. W., Pankhurst, P. M. & Battaglione, S. C. 2006. Effect of turbidity, prey density and culture history on prey consumption by greenback flounder *Rhombosolea tapirina* larvae. *Aquaculture*, 253, 447-460.
- Shei, M., Miranda Filho, K., Rodrigues, R. & Sampaio, L. 2010. Production of juvenile barber goby *Elacatinus figaro* in captivity: developing technology to reduce fishing pressure on an endangered species. *Marine Biodiversity Records*, 3.
- Shei, M. R. P., Rodrigues, R. V. & Sampaio, L. S. A. 2012. Use of commercial live feeds enrichment during first feeding period of the barber goby *Elacatinus figaro*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 1, 9, 12.
- Silfrônio, M. R. C., Souza, S. L. P. D., Morais, B. a. P., Andrade, G. a. D., Clebson, M. & Olivera, C. R. 2016. Use of the microalga *Nannochloropsis oculata* in the rearing of newborn longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) juveniles. *Aquaculture Research*, 47, 3934-3941.
- Stuart, K. R. & Drawbridge, M. 2011. The effect of light intensity and green water on survival and growth of cultured larval California yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 321, 152-156.
- Teitelbaum, A., Yeeting, B., Kinch, J. & Ponia, B. 2010. Aquarium trade in the Pacific. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin*, 19, 3-6.
- Thornhill, D. 2012. Ecological Impacts and Practices of the Coral Reef Wildlife Trade, *Defenders of Wildlife*.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E. & Razak, T. 2003. From Ocean to Aquarium: The Global Trade in Marine Ornamental Species, *UNEP World Conservation Monitoring Centre*.
- Wilkerson, J. D. 1998. Clownfishes: A Guide to Their Captive Care, Breeding & Natural History, *Microcosm*.
- Wittenrich, M. L. 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes, Neptune City; Charlotte, *T.F.H : Microcosm*.
- Wittenrich, M. L. & Turingan, R. 2011. Linking functional morphology and feeding performance in larvae of two coral-reef fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 92, 295-312.
- Wood, E. 2001. Global Advances in Conservation and Management of Marine Ornamental Resources. *Aquarium Sciences and Conservation*, 3, 65-77.
- Wullur, S., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. 2009. The minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp: Culture and feeding to small mouth marine fish larvae. *Aquaculture*, 62-67.