

## UTILIZAÇÃO DE *Thalassiosira weissflogii* EM LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

SILVA<sup>1,2,5</sup>, B.C.; ANDRE, R.C.<sup>1</sup>; BELETTINI<sup>1,4</sup>, F.; BUGLIONE<sup>1,3</sup>, C.C.; JATOBÁ<sup>1,3</sup>, A.; VIEIRA<sup>1,3</sup>, F.N.; ANDREATTA, E.R.<sup>1,4</sup>; DERNER<sup>1,4</sup>, R.B.; MOURIÑO<sup>1,4,6</sup>, J.L.

<sup>1</sup> - Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Camarões Marinhos, Florianópolis-SC, Barra da Lagoa; R. Beco dos Coroas (fundos), s/n, 88062-601; <sup>2</sup> - Curso de Graduação em Engenharia de Aquicultura-UFSC; <sup>3</sup> - Programa de pós graduação em Aquicultura – UFSC; <sup>4</sup> - Laboratório de Camarões Marinhos-UFSC. 5 – bcs85@hotmail.com; 6 – mourino@icm.ufsc.br

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes densidades celulares da microalga *Thalassiosira weissflogii* na alimentação de larvas de *Litopenaeus vannamei*, e avaliar sua utilização em escala comercial. Para avaliar a densidade algal adequada foram utilizados três tratamentos, 0,5; 1,0 e 2,0 x 10<sup>4</sup> células/mL. Na avaliação em escala comercial comparou-se a utilização de *T. weissflogii* com *Chaetoceros muelleri*, quanto à metamorfose, sobrevivência e peso final. Os resultados mostraram que a densidade de 2,0 x 10<sup>4</sup> cels/mL apresentaram menor sobrevivência e a água do cultivo maiores concentrações de nutrientes e contagem de bactérias totais em comparação com os tratamentos de 0,5 e 1,0 x 10<sup>4</sup> células/mL ( $p < 0,05$ ), que não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros analisados. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados entre as duas espécies de microalgas utilizadas na larvicultura comercial ( $p > 0,05$ ). Os resultados mostraram que a densidade de 2,0 x 10<sup>4</sup> cels/mL de *T. weissflogii* pode causar prejuízos para a larvicultura de camarões, devido à degradação da qualidade da água causada pela introdução de maiores volumes de inóculos de microalgas, gerando acúmulo de nutrientes e o aumento da carga bacteriana. O uso de *T. weissflogii* em larviculturas comerciais apresentou resultados satisfatórios para a produção de larvas de *L. vannamei*.

**PALAVRA-CHAVE:** Camarão marinho, microalga, qualidade de água, qualidade larval.

### ABSTRACT

#### EVALUATION OF *Thalassiosira weissflogii* IN *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) LARVAL REARING.

The objective of this work was to establish the effects of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* in different densities added to experimental *L. vannamei* larval rearing, as well as assess its use in commercial-scale production. To evaluate the algal densities, were tested three treatments (0.5, 1 and 2 x 10<sup>4</sup> cells/mL) in experimental conditions. In the commercial-scale larval rearing was compared the use of *T. weissflogii* with *Chaetoceros muelleri* as regard to shrimp metamorphosis, final survival and final weight. The results showed that larvae fed with 2 x 10<sup>4</sup> cells/mL presented low survival and the culture water became highly concentrated with nutrients and total bacteria counts when compared to treatments 0.5, 1 x 10<sup>4</sup> cells/mL ( $p < 0.05$ ), which no statistically significant differences were observed in both treatments ( $p > 0.05$ ) for analyzed parameters. No significant differences were observed in the parameters tested between microalgae species in the commercial-scale larval rearing ( $p > 0.05$ ). Results demonstrate that *T. weissflogii* at a density of 2 x 10<sup>4</sup> cells/mL can be detrimental to shrimp larval rearing due to decay in water quality caused by the introduction of high microalga inoculum, which generates accumulation of nutrients and increase of total bacteria. The use of *T. weissflogii* showed good results and can be adopted in commercial-scale of the *L. vannamei* larval rearing.

**KEY-WORDS:** marine shrimp, microalgae, water quality, larval rearing

## INTRODUÇÃO

As larvas de camarões marinhos possuem exigências de ácidos graxos insaturados, principalmente da família n-3 e n-6 (Brown *et al.* 1997). Em larviculturas de peneídeos, no estágio de protozoa, esta exigência nutricional é cumprida com o fornecimento de microalgas marinhas. Estas são na sua maioria ricas em ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), principalmente os ácidos docosahexanóico (DHA) e eicosapentanóico (EPA) (Piña *et al.* 2006).

Segundo Coutteau (1996) as diatomáceas têm sido consideradas o grupo de microalgas mais importante na alimentação de larvas de camarões marinhos. O gênero *Chaetoceros*, principalmente a espécie *C. muelleri*, é o mais utilizado nas larviculturas de peneídeos para alimentação de seus estádios larvais, principalmente protozoa (Gomez-Gil *et al.* 2002, Piña *et*

*al.* 2005, Jaime-Ceballos *et al.* 2006). Diversos artigos (D'Souza & Loneragan 1999, D'Souza *et al.* 2002, Piña *et al.* 2006) apontam esta microalga obtendo bons resultados no desenvolvimento e na sobrevivência das larvas de peneídeos em diversos trabalhos.

*Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle, anteriormente conhecida como *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt, é outra diatomácea com potencial para uso na larvicultura de camarões marinhos, por apresentar alto valor nutricional (Arredondo-Vega *et al.* 2004). Emmerson (1980) relatou que larvas de *Penaeus indicus* alimentadas com *T. weissflogii* apresentaram rápido crescimento em comparação com larvas alimentadas com outras espécies de microalgas. Olivera *et al.* (1993) também relataram resultados semelhantes, sendo que as larvas de *Litopenaeus schmitti* alimentadas com *T. weissflogii* (como *T. fluviatilis*) apresentaram melhor sobrevivência e

desenvolvimento larval do estágio de protozoa para o estágio de misis.

Além do valor nutricional a disponibilidade do alimento é um fator importante no desenvolvimento das larvas. Segundo Piña *et al.* (2005) há informações de respostas de ingestão e crescimento para diferentes concentrações de alimentos para larvas de algumas espécies de peneídeos. Emmerson (1980) e Piña *et al.* (2005) estudaram a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento larval a partir do estágio de náuplio V até protozoa I com diferentes densidades das algas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri* para larvas das espécies *Penaeus indicus* e *Litopenaeus vannamei*, respectivamente. Porém os efeitos das baixas ou altas densidades das microalgas não são bem estudados para o estágio de protozoa da espécie *L. vannamei*.

Em excesso, as microalgas podem causar problemas em larviculturas, como acumular nitrogênio dissolvido na água de cultivo, principalmente na forma de amônia, pelo maior consumo e excreção das larvas (Thompson *et al.* 2002) ou servir de vetores de microrganismos patogênicos para camarões (Kurmaly *et al.* 1989 apud Robinson *et al.* 2005).

Um dos principais problemas no cultivo de camarões relacionado com a qualidade de água é a toxicidade do nitrito e da amônia, este último sendo mais tóxico em pH básico onde predomina a forma não ionizada (Wright 1995, Zhao *et al.* 1997). O aporte de material orgânico, como restos de alimento e fezes, também pode causar prejuízo em larviculturas devido ao aparecimento de bactérias oportunistas, como *Vibrio spp.*, levando a importantes mortalidades (Mouriño *et al.* 2008a).

Nas fases de desenvolvimento embrionário e larval, os camarões são mais sensíveis aos altos níveis de amônia (Ostrensky & Wasielesky Jr. 1995). A redução da sobrevivência e do crescimento dos camarões causados pelas doses sub-letais ou letais da amônia tóxica, ou não ionizada, podem causar prejuízos consideráveis na aquicultura (Barajas *et al.* 2006).

Os nutrientes que podem acumular em tanques ou viveiros de cultivo de camarão (amônia, nitrato, fosfato) são essenciais para o crescimento das bactérias, e quanto maior a concentração dos nutrientes no meio maior o crescimento destas (Madigan *et al.* 2004). Segundo alguns autores

(Salvensen *et al.* 1999, Thompson *et al.* 1999, D'Souza *et al.* 2002, Mouriño *et al.* 2008a), o número total de bactérias nos tanques de cultivo pode alcançar níveis bastante elevados depois da introdução de microalgas e alimentos vivos, que podem trazer consigo uma carga elevada de nutrientes residuais ou de bactérias heterotróficas associadas a estes microrganismos.

Este estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes densidades celulares da microalga *T. weissflogii* sobre a sobrevivência das larvas de *L. vannamei* nos estádios de náuplio V a protozoa III, aos parâmetros de qualidade de água e microbiológicos; e avaliar o uso de *T. weissflogii* em larviculturas de *L. vannamei* em escala industrial em comparação com *Chaetoceros muelleri* quanto à metamorfose, sobrevivência e peso final das larvas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no município de Florianópolis, no Estado de Santa Catarina. O Laboratório está habilitado para produzir cerca de 60 milhões de pós-larvas de camarão marinho por mês.

### Experimento 1

Para avaliação da densidade de *Thalassiosira weissflogii* na larvicultura de *Litopenaeus vannamei* foram testadas três densidades diferentes, com três réplicas, em um delineamento completamente casualizado. Os tratamentos experimentais foram:  $0,5 \times 10^4$  células/mL (tratamento TW0,5),  $1,0 \times 10^4$  células/mL (tratamento TW1) e  $2,0 \times 10^4$  células/mL (tratamento TW2) de *T. weissflogii*.

Cada unidade experimental foi constituída por 1 tanque de fibra de vidro com formato cilindro-cônico com capacidade de 50 litros, os quais foram povoados com 5000 náuplios V. A salinidade e a temperatura da água de cultivo foram mantidas nos seguintes níveis: 35 ppm e  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente, possuindo aeração constante. O experimento foi conduzido até a metamorfose para o estágio de protozoa III, quando foram feitas as contagens das larvas para determinar a sobrevivência

em cada unidade experimental. A coleta foi realizada em três amostras de 100 mL após o aumento da aeração nos tanques para homogeneização, e em seguida feita a contagem das larvas. A média das contagens foi extrapolada para o volume do tanque e a sobrevivência calculada em porcentagem através da equação abaixo:

$$S = \frac{NLF}{NLP} \times 100$$

S = sobrevivência (%)

NLF = número de larvas estimadas no final do experimento.

NLP = número de larvas povoadas no início do experimento.

Diariamente foram realizadas contagens da densidade das microalgas em todas as unidades experimentais, com auxílio de câmara de Neubauer, e reinoculado *T. weissflogii* para manutenção da densidade algal do delineamento.

Para as análises microbiológicas, foram coletadas assepticamente em tubos de 10 mL amostras da água das unidades experimentais no início e no final do experimento. As amostras foram diluídas em série 1/10 até  $10^{-4}$  em tubos contendo solução salina estéril (3% de NaCl). Uma alíquota (0,1 mL) das diluições foi semeada em meios de cultura para bactérias totais marinhas (Agar Marine, Difco) e para vibriónaceas (Agar Tiossulfato Citrato Bile Sucrose – TCBS, Difco). As placas foram incubadas em estufa para crescimento bacteriano a 30°C durante 24 horas para posterior contagem total das unidades formadoras de colônias viáveis por mililitros de amostra (UFC/mL). Nas placas de TCBS foram feitas contagens totais de colônias viáveis e estas foram separadas em colônias fermentadoras de sacarose (amarelas) e colônias não fermentadoras de sacarose (verdes).

Para mensurar os parâmetros de qualidade de água (amônia total, nitrito, nitrato, fosfato e silicato), diariamente foram coletadas amostras da água de cada unidade experimental em garrafas de coleta de plástico de 250 mL, com rosca. As leituras dos resultados foram realizadas em espectrofotômetro, seguindo metodologia descrita por Baumgarten *et al.* (1996).

A amônia total dissolvida foi mensurada pelo método de Solorzano (1977) modificado por

Strickland & Parsons (1972). O nitrito dissolvido foi determinado pela reação de Griess descrita por Bendschneider & Robinson (1952). Para quantificação do nitrato dissolvido utilizou-se o método adaptado de Wood *et al.* (1967). O fosfato total dissolvido foi mensurado pelo método de Murphy & Riley (1962) e a sílica segundo método de Mullin & Riley (1955). Os métodos utilizados para a determinação do nitrito, nitrato, fosfato e silício estão descritos por Aminot & Chaussepied (1983).

## Experimento 2

Para avaliação da utilização de *T. weissflogii* na larvicultura de *L. vannamei* em escala comercial foram utilizados dois tratamentos (*T. weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*) com seis réplicas para cada, seguindo o delineamento completamente casualizado. Cada réplica foi formada por tanques com formato retangular com fundo em U, de fibra de vidro com capacidade de 20 toneladas de água marinha com entrada e saída de água em lados opostos do tanque, possuindo sistema de aeração e aquecimento central para manter a temperatura constante.

No preparo da água foram inoculadas as microalgas *T. weissflogii* na densidade de  $0,5 \times 10^4$  cels/mL, a qual foi mantida diariamente durante toda a larvicultura e *C. muelleri* na densidade de  $10 \times 10^4$  cels/mL até mysis I,  $6 \times 10^4$  cels/mL até pós-larva 1, e em  $5 \times 10^4$  cels/mL após este estágio até o final da larvicultura, no estágio de pós-larva 12 (LCM, 2007).

Os tanques foram inoculados com  $3,4 \pm 0,8$  milhões de náuplios V. A temperatura foi mantida em  $31 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , e o oxigênio acima de 3,5 mg/L. A renovação de água foi de 100% ao dia, e foi realizada através de telas, adequando o tamanho destas ao tamanho das larvas, como recomendado pelas instruções normativas do protocolo de operação PO-4 do LCM-UFSC (LCM, 2007). Ao final de cada renovação de água eram feitas as contagens das densidades de microalgas, com auxílio da câmara de Neubauer, e calculado o volume necessário de cultura de microalga para manter as densidades desejadas.

As larvas foram alimentadas inicialmente, além das microalgas, com as dietas descritas na tabela 1, segunda as normativas do protocolo de operação PO-4 do LCM-UFSC (LCM, 2007).

Tabela 1 – Alimentação larval diária do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* na larvicultura do LCM-UFSC.

| Estágio da larva    | Artêmia<br>(náuplios de<br>artemia/larva de<br>camarão) |    |       |    | Ração<br>(g/milhão de larvas) |    |    |    | Flake<br>(g/milhão<br>de larvas) | Dieta<br>líquida<br>(mL/milhã<br>o de larva) |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------|----|-------|----|-------------------------------|----|----|----|----------------------------------|----------------------------------------------|----|
|                     | manhã                                                   |    | tarde |    | F1                            | F2 | F3 | F4 |                                  | O1                                           | O2 |
|                     | Náuplio 3                                               | -  | -     | -  | -                             | -  | -  | -  |                                  | -                                            | -  |
| Náuplio 4           | -                                                       | -  | -     | -  | -                             | -  | -  | -  | -                                | -                                            | -  |
| Náuplio 5           | -                                                       | -  | -     | -  | -                             | -  | -  | -  | -                                | -                                            | -  |
| Protozoa 1          | -                                                       | -  | -     | -  | 15                            | -  | -  | -  | -                                | 5                                            | -  |
| Protozoa 2          | -                                                       | -  | -     | -  | 15                            | -  | -  | -  | -                                | 8                                            | -  |
| Protozoa 2/3        | -                                                       | -  | -     | -  | 20                            | -  | -  | -  | -                                | 9                                            | -  |
| Protozoa 3          | -                                                       | -  | -     | -  | 30                            | -  | -  | -  | -                                | 10                                           | -  |
| Protozoa 3/Misis 1  | -                                                       | 2C | 4C    | 4C | 30                            | -  | -  | -  | -                                | 12                                           | -  |
| Misis1              | 4C                                                      | 4C | 4C    | 4C | -                             | 24 | -  | -  | 6                                | 13                                           | -  |
| Misis 2             | 4C                                                      | 4C | 4C    | 4C | -                             | 24 | -  | -  | 6                                | 17                                           | -  |
| Misis 3             | 4C                                                      | 4C | 4C    | 4C | -                             | 28 | -  | -  | 7                                | 18                                           | -  |
| Misis 3/Pós-larva 1 | 10                                                      | -  | 15    | 15 | -                             | 23 | -  | -  | 12                               | -                                            | 20 |
| Pós-larva 1         | 15                                                      | -  | 15    | 25 | -                             | -  | 23 | -  | 12                               | -                                            | 22 |
| Pós-larva 2         | 18                                                      | -  | 23    | 23 | -                             | -  | 23 | -  | 12                               | -                                            | 24 |
| Pós-larva 3         | 20                                                      | -  | 25    | 25 | -                             | -  | 27 | -  | 13                               | -                                            | 25 |
| Pós-larva 4         | 20                                                      | -  | 25    | 25 | -                             | -  | -  | 27 | 13                               | -                                            | 26 |
| Pós-larva 5         | 26                                                      | -  | 26    | 26 | -                             | -  | -  | 30 | 15                               | -                                            | 26 |
| Pós-larva 6         | 26                                                      | -  | 26    | 26 | -                             | -  | -  | 33 | 17                               | -                                            | 27 |
| Pós-larva 7         | 26                                                      | -  | 26    | 26 | -                             | -  | -  | 53 | 27                               | -                                            | 27 |
| Pós-larva 8-12      | 26                                                      | -  | 26    | 26 | -                             | -  | -  | 60 | 30                               | -                                            | 28 |

C – Náuplios de artêmia congelado, F1 - Frippak INVE 1, F2 - Frippak INVE 2, F3 - Frippak INVE 3, F4 - Frippak INVE 4, O1 - Ocean Drops 1, O2 - Ocean Drops 2.

No início da larvicultura, quando as larvas passaram para o estágio de misis I, foi calculada a sobrevivência após a metamorfose ou “taxa de virada” (número de misis estimada dividido pelo número de náuplios V usados no povoamento). No final do experimento, no estágio de pós-larvas 12, foi estimada a sobrevivência final e o peso final. Durante a larvicultura também foram observadas semanalmente a qualidade larval (necroses, deformidades, cromatóforo, epibiontes, síndrome de “bolitas”), que foi determinada através da ficha de

qualidade de larvas do protocolo de operação FM-03/PO-4 do LCM citada em Mouriño *et al.* (2008a), adaptado de FAO (2004).

A sobrevivência final da larvicultura foi estimada a partir do peso das pós-larvas. O peso médio final das pós-larvas foi determinado por 4 amostras de 100 mL, onde foi contado o número total de larvas e posteriormente concentrada em peneira de 100 µm para a pesagem em balança de precisão (0,001 g). A sobrevivência e o peso médio foram determinados pelas seguintes equações:

$$S = \frac{(PT/PL)}{NNP} \times 100$$

S= Sobrevivência final (%)

PT= Peso total das pós-larvas que saíram do tanque

PL= Peso médio das pós-larvas estimadas por amostragem

NNP= Número total de náuplios V povoados no tanque

$$PL = \frac{PA}{NP}$$

PA= Peso da amostra de pós-larvas

NP= Número de pós-larvas amostradas

### Análises estatísticas

Os dados de sobrevivência das larvas de *L. vannamei*, das análises microbiológicas e dos

parâmetros de qualidade da água foram analisados quanto à homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Quando as variâncias dos tratamentos

mostraram-se heterogêneas, os dados foram transformados em log (x+1) e posteriormente submetidos a análise de variância ( $p < 0,05$ ) para os dados de sobrevivência e análise de variância com parcelas subdivididas no tempo ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros de qualidade de água e análises microbiológicas da água. Uma vez encontrada diferença significativas entre os tratamentos, foi utilizado o teste de diferença de médias, Tukey ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996). As relações dos dados obtidos no experimento 1 foram analisadas através da análise de componente principal (ACP), baseada na matriz de correlação das variáveis analisadas, onde se constrói

um sistema de eixos para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões, neste caso apenas duas (Valentin, 2000).

## RESULTADOS

### Experimento 1

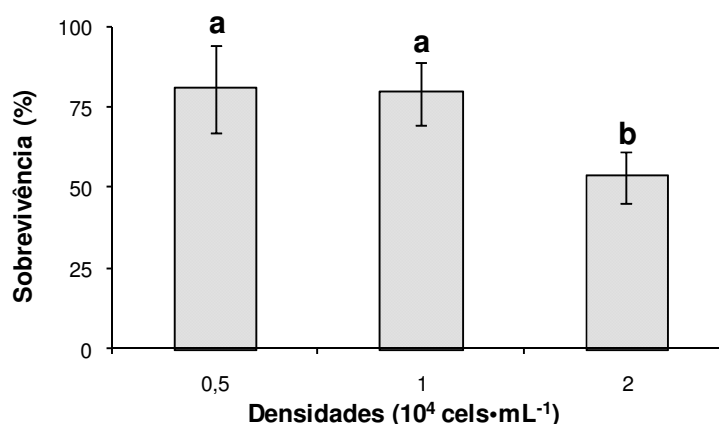
Nos parâmetros amônia, nitrito, nitrato e fosfato a água dos tratamentos TW0,5 e TW1 foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), enquanto que o tratamento TW2 apontou as maiores concentrações dos nutrientes ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações de nutrientes dissolvidos na água (Média  $\pm$  desvio padrão) de cultivo nas larviculturas experimentais mantidas com três densidades diferentes de *Thalassiosira weissflogii* (TWE).

|                       | TWE x 10 <sup>4</sup><br>(UFC/mL) | NH <sub>3</sub> -N<br>(mg/L) | NO <sub>2</sub><br>(mg/L) | NO <sub>3</sub><br>(mg/L) | PO <sub>4</sub><br>(mg/L) | SiO <sub>3</sub><br>(mg/L) |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 <sup>o</sup><br>dia | 0,5                               | 0,16 $\pm$ 0,01 a            | 0,03 $\pm$ 0,01 a         | 0,15 $\pm$ 0,27 a         | 0,51 $\pm$ 0,10 a         | 0,66 $\pm$ 0,12 a          |
|                       | 1,0                               | 0,17 $\pm$ 0,02 a            | 0,04 $\pm$ 0,01 a         | 0,06 $\pm$ 0,10 a         | 0,52 $\pm$ 0,03 a         | 0,93 $\pm$ 0,20 a          |
|                       | 2,0                               | 0,20 $\pm$ 0,01 b            | 0,06 $\pm$ 0,01 b         | 1,22 $\pm$ 0,35 b         | 0,79 $\pm$ 0,05 b         | 1,09 $\pm$ 0,24 a          |
| 2 <sup>o</sup><br>dia | 0,5                               | 0,15 $\pm$ 0,02 a            | 0,03 $\pm$ 0,01 a         | 0,16 $\pm$ 0,12 a         | 0,33 $\pm$ 0,11 a         | 0,67 $\pm$ 0,17 a          |
|                       | 1,0                               | 0,16 $\pm$ 0,01 a            | 0,04 $\pm$ 0,01 a         | 0,39 $\pm$ 0,18 a         | 0,20 $\pm$ 0,08 a         | 0,93 $\pm$ 0,21 a          |
|                       | 2,0                               | 0,20 $\pm$ 0,02 b            | 0,06 $\pm$ 0,01 b         | 1,11 $\pm$ 0,40 b         | 0,63 $\pm$ 0,13 b         | 1,09 $\pm$ 0,27 a          |
| 3 <sup>o</sup><br>dia | 0,5                               | 0,06 $\pm$ 0,02 a            | 0,03 $\pm$ 0,01 a         | 0,01 $\pm$ 0,00 a         | 0,02 $\pm$ 0,01 a         | 0,46 $\pm$ 0,06 a          |
|                       | 1,0                               | 0,07 $\pm$ 0,02 a            | 0,03 $\pm$ 0,01 a         | 0,01 $\pm$ 0,00 a         | 0,02 $\pm$ 0,01 a         | 0,56 $\pm$ 0,22 a          |
|                       | 2,0                               | 0,12 $\pm$ 0,02 b            | 0,06 $\pm$ 0,01 b         | 0,56 $\pm$ 0,11 b         | 0,06 $\pm$ 0,01 b         | 0,54 $\pm$ 0,11 a          |
| 4 <sup>o</sup><br>dia | 0,5                               | 0,12 $\pm$ 0,02 a            | 0,04 $\pm$ 0,01 a         | 0,36 $\pm$ 0,28 a         | 0,74 $\pm$ 0,05 a         | 0,68 $\pm$ 0,08 a          |
|                       | 1,0                               | 0,13 $\pm$ 0,03 a            | 0,05 $\pm$ 0,01 a         | 0,81 $\pm$ 0,27 a         | 0,82 $\pm$ 0,09 a         | 0,74 $\pm$ 0,17 a          |
|                       | 2,0                               | 0,21 $\pm$ 0,03 b            | 0,09 $\pm$ 0,01 b         | 1,67 $\pm$ 0,39 b         | 0,99 $\pm$ 0,06 b         | 0,80 $\pm$ 0,16 a          |

As larvas de *L. vannamei* do tratamento TW2 apresentaram uma menor sobrevivência com 53,4  $\pm$  8,1%, sendo significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) às

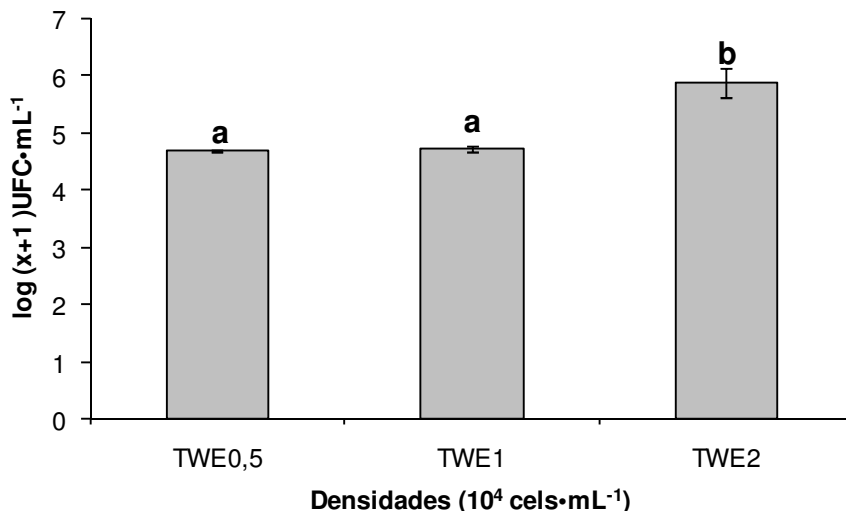
larvas dos tratamentos TW0,5 e TW1 que obtiveram 80,7  $\pm$  13,7% e 79,4  $\pm$  9,8%, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1** - Sobrevivência (média  $\pm$  desvio padrão) do *Litopenaeus vannamei* na fase de protozoa III nas larviculturas do experimento I mantidas com três densidades diferentes de *Thalassiosira weissflogii*. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de separação de médias ( $p < 0,05$ ).

As contagens de bactérias totais e de vibriáceas na água de cultivo, no início do experimento não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao final do experimento a água de cultivo do tratamento TW2

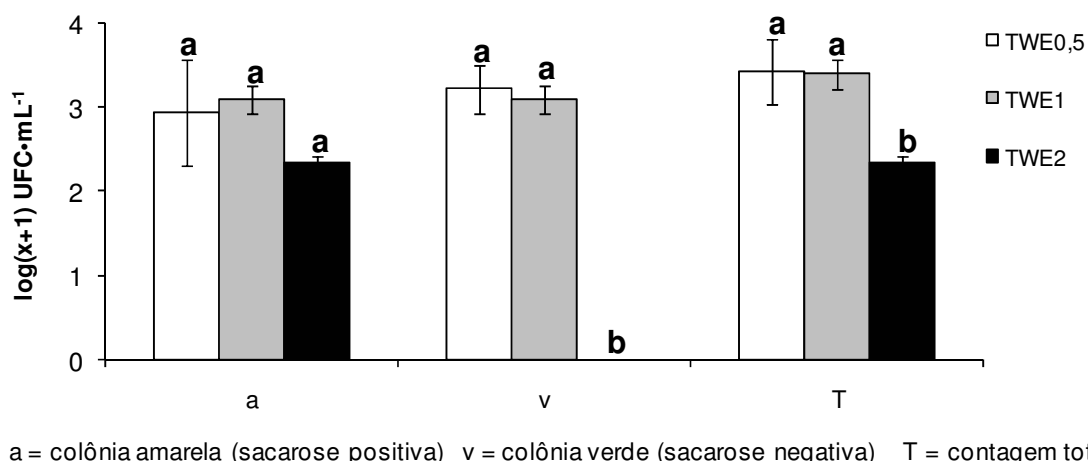
apresentou uma contagem significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de bactérias totais,  $8,3 \pm 4,5 \times 10^5$  UFC/mL (Figura 2), e menor para as vibriáceas,  $2,2 \pm 0,4 \times 10^2$  UFC/mL (Figura 3) em relação aos demais tratamentos.



**Figura 2** - Contagem (média  $\pm$  desvio padrão) de bactérias marinhas totais na água final das larviculturas do experimento I mantidas com três densidades diferentes de *Thalassiosira weissflogii* (TWE0,5 =  $0,5 \times 10^4$  células/mL, TWE1,0 =  $1 \times 10^4$  células/mL e TWE 2 =  $2,0 \times 10^4$  células/mL). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de separação de médias ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto à contagem de colônias sacarose positiva, enquanto que para a sacarose negativa a contagem

de colônias da água do tratamento TW2 foi significativamente menor que os demais (Figura 3).



**Figura 3** - Contagem (médias  $\pm$  desvio padrão) de *Vibrio* na água final das larviculturas do experimento I mantidas com três densidades diferentes de *Thalassiosira weissflogii* (TWE0,5 =  $0,5 \times 10^4$  células/mL, TWE1,0 =  $1,0 \times 10^4$  células/mL e TWE 2,0 =  $2,0 \times 10^4$  células/mL). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de separação de médias ( $p < 0,05$ ).

A comparação da água dos tratamentos TW0,5 e TW1 não evidenciou diferença significativamente

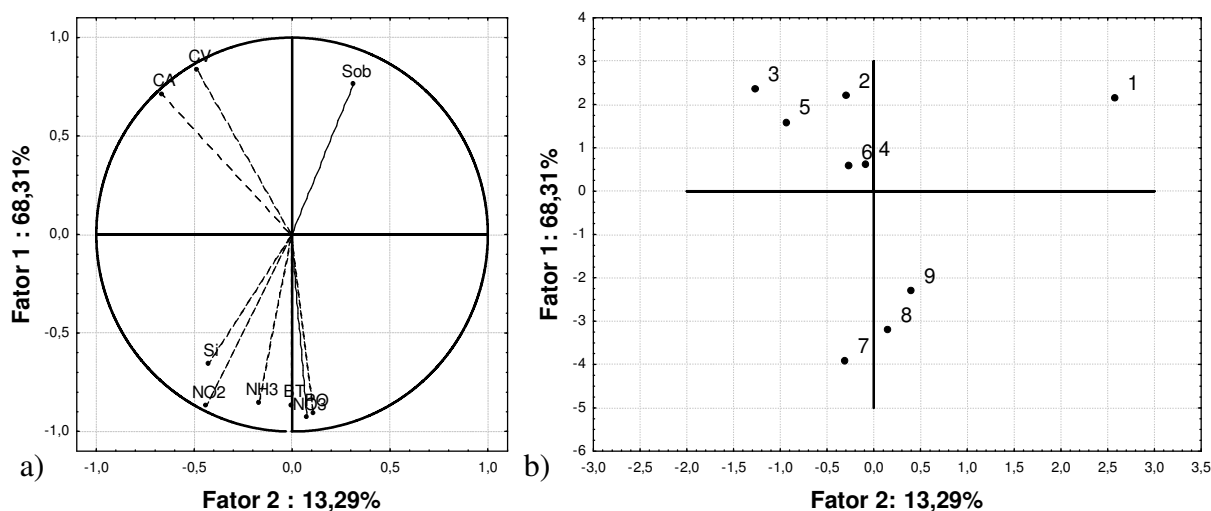
para todos parâmetros microbiológicos avaliados ( $p > 0,05$ ). Suas médias foram  $5,5 \pm 0,26 \times 10^4$  UFC/mL e

$4,6 \pm 0,62 \times 10^4$  UFC/ml para bactérias totais, respectivamente,  $3,3 \pm 2,9 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,34 \pm 1,15 \times 10^3$  UFC/mL para vibriónceas (Fig. 2 e 3).

Não houve interação ( $p > 0,05$ ) entre nenhum dos parâmetros de qualidade de água avaliados e os dias de avaliação. Contudo, foi observada diferença significativa em todos os parâmetros de qualidade água avaliados, exceto sílica ( $p > 0,05$ ), entre os

tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

A análise de componente principal sintetiza a relação dos tratamentos com os parâmetros de qualidade de água, microbiológicos e sobrevivência (Figura 4). O resultado desta análise explica 81,60 % da variância dos dados (68,31 % e 13,29% dos eixos de variação 1 e 2, respectivamente).



**Figura 4** – Análise de componente principal (ACP) para a comparação dos parâmetros de qualidade de água, microbiologia e sobrevivência. (a) Círculo de autovetores das variáveis (Sob = sobrevivência; BT = bactérias totais; SP = Colônias sacarose positivas; SN = Colônias sacarose negativa; NH<sub>3</sub> = Amônia; NO<sub>2</sub> = nitrito; NO<sub>3</sub> = nitrato; PO = fosfato, Si = Silicato). (b) Plano de dispersão das réplicas (1 a 3 =  $0,5 \times 10^4$  células/ mL; 4 a 6 =  $1 \times 10^4$  células/ mL; 7 a 9 =  $2 \times 10^4$  células/ mL).

O eixo de variação 1 é positivamente influenciado pela contagem total de Vibrios (tanto pelas colônias fermentadoras ou não de sacarose), e negativamente influenciado pelo número de bactérias totais e pela concentração dos nutrientes. O eixo de variação 2 é influenciado positivamente pela sobrevivência.

A ACP revela certa distinção entre as réplicas que contribuem para o primeiro e para o segundo eixo. O tratamento TW0,5 é representado pelas réplicas de 1 a 3; o TW1 de 4 a 6 e o TW2 de 7 a 9. As variáveis que mais contribuíram positivamente para o eixo de variação 1 foram as 2, 3 e 5; e as que contribuíram negativamente foram as 7, 8 e 9. Enquanto que a variável 1 contribuiu positivamente para o eixo de variância 2.

A posição mais à direita no eixo 2 da réplica 1 está altamente correlacionado com a alta sobrevivência deste. Enquanto a posição das réplicas 8 e 9 está mais relacionado às altas concentrações

de nitrato e fosfato. A posição mais acima no eixo 1 e à esquerda do eixo 2, das réplicas 2, 3 e 5, estão positivamente correlacionadas com os maiores contagens de Vibrios e negativamente correlacionadas com as contagens de bactérias totais e dos nutrientes em geral.

## Experimento 2

Os resultados das larviculturas de *L. vannamei* em escala industrial utilizando a microalga *T. weissflogii* não apresentaram diferença significativa quanto à “taxa de virada”, peso médio e sobrevivência ( $p < 0,05$ ) comparado com as larviculturas utilizando *C. muelleri*, (Tabela 3). A qualidade das larvas observadas durante todo período de larvicultura se mantiveram com índice “ótimo”, segundo a pontuação da ficha de qualidade larval citada em Mouriño *et al.* (2008a).

Tabela 3 – Avaliação da *T. weissflogii* e da *C. muelleri* em larviculturas comerciais de *L. vannamei*.

|            |        | Nº povoado | Taxa de virada (%) | Peso final (mg) | Sobrevivência (%) | Qualidade larval |
|------------|--------|------------|--------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| <b>TWE</b> | Média  | 3676666 a  | 90,12 a            | 3,66 a          | 74,74 a           | Ótimo            |
|            | Desvio | 533729     | 11,86              | 0,88            | 13,35             |                  |
| <b>CMU</b> | Média  | 3146666 a  | 81,09 a            | 3,16 a          | 64,40 a           | Ótimo            |
|            | desvio | 1031614    | 10,73              | 1,27            | 17,71             |                  |

## DISCUSSÃO

A baixa sobrevivência no experimento 1 do *Litopenaeus vannamei* no estágio de protozoa no tratamento de maior densidade algal ( $2 \times 10^4$  células/mL) de *Thalassiosira weissflogii* provavelmente está relacionado com as maiores concentrações dos nutrientes e carga bacteriana, apresentados na água deste tratamento.

Artiles-Rodriguez (2000 apud Piña *et al.* 2005) encontrou um efeito negativo na superalimentação na sobrevivência larval de *L. schmitti*, que pode ser explicado pelo efeito tóxico de metabólicos das microalgas ou pela natação errática das larvas, causada pelo comprimento excessivo de filamentos fecais. Diferentemente, Piña *et al.* (2005) demonstraram que o aumento da oferta de *C. muelleri*, de  $4$  a  $12 \times 10^4$  células/mL para  $12$  a  $30 \times 10^4$  células/mL, não interferiu no crescimento do *L. vannamei* no estágio de protozoa, considerando assim, a alimentação cautelosa, ou em menores densidades de microalga, a melhor estratégia no cultivo de larva desta espécie.

Neste trabalho, a maior oferta de microalga teve como consequência a piora na qualidade de água, causado pelo aumento da concentração de nutrientes como a amônia, nitrito, nitrato e fosfato. Porém, a concentração de nutrientes não se deu ao longo do tempo, sendo provavelmente causada pelo meio de cultura residual do inóculo de microalga, já que o tratamento com maior densidade de microalgas necessita da introdução de um maior volume de microalgas.

No estudo de Jensen *et al.* (2006) para avaliar a influência da *T. weissflogii* (como *T. fluviatilis*) na qualidade da água e no desempenho das pós-larvas de *Farfantepenaeus paulensis*, verificaram que a adição de microalga nos berçários aumentou nas

concentrações de amônia, nitrito e ortofosfatos, e os autores atribuem esse aumento ao meio de cultura residual dos tanques de cultivo de microalgas.

A ACP neste estudo revelou uma alta correlação positiva entre as réplicas do tratamento 3 (com maior concentração de microalgas) com as maiores concentrações dos nutrientes e maior contagem de bactérias totais. As réplicas dos demais tratamentos mostraram perfis bastante parecidos com maiores sobrevivências e maiores contagens de Vibrios, porém com baixas contagens de bactérias totais e menores concentrações dos nutrientes. Com exceção das larvas da réplica 1 que apresentou a maior sobrevivência e mostrou baixa contagem de Vibrios.

Os resultados apontam que as maiores densidades de *Thalassiosira weissflogii* ou as maiores quantidades de inóculos destas nos tanques de larvicultura estão correlacionados com uma baixa qualidade de água e conseqüentemente uma menor sobrevivência das larvas de *Litopenaeus vannamei*.

A alta concentração de nutrientes tóxicos aos camarões, como o nitrito e a amônia, é causada pela excreção dos animais aquáticos e pela amonificação dos alimentos não consumidos, partículas orgânicas e sedimentos (Wright 1995, Zhao *et al.* 1997). Segundo Liu & Chen (2004) o excesso de amônia afeta o sistema imune de *L. vannamei*, prejudicando seu crescimento e sua sobrevivência (Thompson *et al.* 2002). Já o nitrito nos crustáceos, provoca um aumento da pressão parcial de oxigênio, sugerindo uma elevação do  $O_2$  livre e um decréscimo de  $O_2$  ligado a hemocianina (oxihemocianina), levando o organismo a morte (Chen & Cheng, 1996).

Segundo Boyd & Tucker (1998) os valores máximos adequados para larvas de *Penaeus monodon* de amônia-n (amônia não ionizada mais a amônia ionizada) e de nitrito são de 0,13 e 2,00 mg/L,



respectivamente. No experimento 1, os níveis de amônia se mantiveram próximo ao valor indicado por Boyd & Tucker (1998), porém o tratamento com maior densidade algal ( $0,5 \times 10^4$  cels/mL) apresentou sempre valores acima de 0,19 mg/L (acima de 50% a mais do valor adequado), exceto no terceiro dia. Já as concentrações de nitrito se mantiveram abaixo de 0,09 mg/L, concentração inferior da citada anteriormente como máximo adequado.

Para organismos aquáticos a concentração letal ( $LC_{50}$ ) após 96 h para nitrato chega a 1000 mg/L após 96 horas (Boyd & Tucker, 1998), porém Muir *et al.* (1991), demonstraram que a concentração de 1,0 mg/L é letal para o protozoa *Penaeus monodon*, constituindo o mais baixo relato da toxicidade aguda do nitrato para organismos marinhos. No experimento 1, o único tratamento que esteve acima da concentração de 1,0 mg  $NO_3-N/mL$  foi o tratamento TWE2, exceto no terceiro dia.

Neste estudo, a má qualidade de água, causada pelo aumento da concentração de nutrientes e conseqüentemente pelo aumento das bactérias totais, provocou maior mortalidade das protozoas de *L. vannamei* em altas densidades de *Thalassiosira weissflogii* e as densidades de  $0,5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^4$  células/mL apresentaram os melhores resultados nos tanques de larvicultura.

O nitrogênio e fósforo são utilizados pelas bactérias heterotróficas para o seu desenvolvimento (Kairesalo *et al.* 1995). Com isto, o acúmulo de nutrientes e de matéria orgânica pode gerar condições propícias para o crescimento e as altas concentrações de bactérias oportunistas, podendo muitas destas ser patogênicas para os camarões.

As principais bacterioses de camarões são causadas pelo gênero *Vibrio*, principalmente pelas espécies: *V. harveyi*, *V. campbellii*, e *V. alginolyticus* e podem infectar tanto larvas como juvenis e adultos de camarão. Essas doenças já causaram mortalidades em larviculturas em diversos países (Álvarez *et al.* 1998, Vandenberghe *et al.* 1999, Soto-Rodriguez *et al.* 2006). Porém, neste experimento a maior concentração de *Vibrio* nos tratamentos TW0,5 ( $5,0 \times 10^3$  UFC/mL) e TW1 ( $4 \times 10^3$  UFC/mL) não causou prejuízos para as protozoas de *L. vannamei*, enquanto que a alta concentração de bactérias totais no tratamento TW2 ( $1,3 \times 10^6$  UFC/mL) contribuiu para

a menor sobrevivência, podendo ter sido causada por outras bactérias oportunistas que não sejam do grupo das vibriónaceas.

As bactérias oportunistas que causam enfermidades em peneídeos além do gênero *Vibrio*, são os gêneros *Leucothrix*, *Thiothrix*, *Flexibacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, estas bactérias estão relacionadas à má qualidade da água (Costa *et al.* 1998, Karunasagar *et al.* 2005, Mouriño *et al.* 2008b). As bactérias filamentosas e os bacilos gram-negativos podem ser as possíveis bactérias que contribuíram para a maior mortalidade do tratamento TW2, já que estas foram encontradas na placas de bactérias totais (Agar marine), através da coloração de gram (dados não quantificados).

Assim, como a quantidade total de *Vibrio*, a quantidade de colônias sacarose positiva e negativas também não interferiram negativamente na sobrevivência das larvas. Maugeri *et al.* (2000) determinaram em seu estudo as espécies que são fermentadoras de sacarose: *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. damsela* e *V. vulnificus*; e as que não são fermentadoras de sacarose: *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* e *V. furnissii*. Segundo Harris *et al.* (1996) a utilização da sacarose por *V. harveyi* é variável, ela pode fermentar ou não esta substância, sendo encontrada colônias com manchas verdes e amarelas ao mesmo tempo em Agar TCBS.

O fato de que os *Vibrios* não alcançaram as concentrações elevadas nas larviculturas, chegando ao máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/mL, pode explicar a não virulência destas bactérias nos tanques de larvicultura. No estudo de Thaithongnum *et al.* (2006) constatou-se que *Vibrio harveyi* causou mortalidades nas larviculturas de camarões com uma concentração de  $7,0 \times 10^4$  UFC/mL.

O mecanismo de "quorum sensing" (comunicação celular) pode regular nas bactérias funções como conjugação, secreção de fatores de virulência, produção de antibióticos, formação de biofilmes e bioluminescência (Defoirdt *et al.* 2004). A virulência de *Vibrio* é regulada por este mecanismo, e estas bactérias produzem toxinas em maior escala quando encontrados em concentrações mais elevadas, devido à comunicação através de moléculas sinais (Kievit & Iglewski 2000, Manefield *et al.* 2000).

Uma das espécies bacterianas mais estudadas quanto ao mecanismo do “quorum sensing” é *V. harveyi*, a qual possui dois mecanismos de comunicação reconhecidos como HAI-1 usado para comunicações intra-espécies, e um sistema conhecido como AI-2 empregado para comunicações inter-espécies (Henke & Bassler 2004). Com isso, outra hipótese para a menor sobrevivência no tratamento TW2, com menor quantidade de *Vibrio* e maior quantidade de bactérias totais, é que o aumento da população bacteriana gerou uma maior concentração de moléculas AHL (moléculas de comunicação) o que pode ter ativado a virulência de algumas espécies de *Vibrio*.

As diatomáceas em geral possuem um ótimo valor nutricional para larvas de peneídeos. No estudo de D´Souza & Loneragan (1999) com as larvas de *Penaeus japonicus* a microalga *Chaetoceros muelleri* proporcionou a maior sobrevivência até misis I, aproximadamente 75%, e as melhores taxas de desenvolvimento, comparado com outras três algas: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis* sp. e *Dunaliella tertiolecta*. Segundo estes autores estas diferenças se devem à melhor composição de ácidos graxos de *C. muelleri*, que possui os maiores valores de EPA e DHA. D´Souza & Loneragan (1999) também citam que outros componentes nutritivos das microalgas importantes para saúde e crescimento das larvas de camarão são as quantidades de proteínas, lipídios e as vitaminas.

Piña *et al.* (2006) também observaram que as larvas de *L. vannamei* alimentadas com a microalga *C. muelleri* apresentaram maior sobrevivência até misis I, variando de 52 a 77%, além do melhor desenvolvimento e comprimento final, comparando também com *T. suecica* e *Isochrysis* sp. D´Souza *et al.* (2002) não observaram diferença significativa na sobrevivência das larvas de *P. monodon* entre *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *Thalassiosira pseudonana*, tendo no total das três microalgas uma sobrevivência média acima de 79% até misis I. Porém, as larvas alimentadas com *C. muelleri* alcançaram o melhor desenvolvimento e o maior peso final entre as larvas alimentadas com as outras duas microalgas.

Segundo Derner (2006) *Thalassiosira weissflogii* (como *T. fluviatilis*) possui um valor nutricional melhor do que *C. muelleri*, devido os maiores valores de proteínas hidrossolúveis, lipídeos

totais e ácidos graxos n-3 (EPA e DHA) e menor valor de carboidratos totais. Este autor determinou os valores de aproximadamente 33,8% de proteínas hidrossolúveis, 16,6% de carboidratos totais, 12,69% de lipídeos totais, 2,79% de EPA e 0,84% de DHA, do total de peso seco. Comparativamente, *C. muelleri* possui, segundo o mesmo autor, 28,9% de proteínas hidrossolúveis, 17,85% de carboidratos totais, 11,2% de lipídeos totais, 0,98% de EPA e 0,16% de DHA do peso seco total. Vale ressaltar que Derner (2006) utilizou as mesmas cepas de microalgas empregadas no desenvolvimento deste trabalho.

As larvas de camarão alimentadas com *T. weissflogii* não mostraram neste estudo uma diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na sobrevivência das larvas alimentadas com *C. muelleri*, porém em percentual foi superior na taxa de virada, sobrevivência e peso final das larvas.

Os resultados com estas duas espécies foram semelhantes ou superiores a outros trabalhos que utilizaram diatomáceas dos gêneros *Chaetoceros* e *Thalassiosira*, sendo os trabalhos citados realizados até o estágio de misis I, onde estes gêneros também mostraram um bom desempenho em larviculturas de peneídeos. Com estes resultados é possível dizer que a utilização da *T. weissflogii* em larviculturas de *L. vannamei* em escala comercial gera resultados satisfatórios, mas não é diferente estatisticamente do resultado com *C. muelleri*, porém numericamente maior.

## CONCLUSÃO

O estudo mostrou que as densidades celulares mais adequadas de *Thalassiosira weissflogii* são entre  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  células/mL. E que as densidades de  $2 \times 10^4$  cels/mL podem causar prejuízos para a larvicultura devido à degradação da qualidade da água causada pela maior introdução de inóculo de microalgas, acarretando acúmulo de nutrientes e o aumento da carga bacteriana.

O uso de *T. weissflogii* em larviculturas industriais na concentração pré-estabelecida apresentou resultados satisfatórios para a produção de larvas em escala comercial, mostrando índices semelhantes aos obtidos com a *Chaetoceros muelleri*, microalga mais utilizada na larvicultura de camarões peneídeos em diversos países.

## AGRADECIMENTOS

Somos especialmente gratos ao querido amigo Professor Elpídio Beltrame, por todo o agradável tempo de convivência e a

ajuda sem a qual seria impossível a realização deste e de outros estudos no Laboratório de Camarões Marinho da Universidade Federal de Santa Catarina.

## REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, J.D.; AUSTIN, B.; ÁLVAREZ, A.M.; REYES, H. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.*, 21: 313–316.
- AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, 395p.
- ARREDONDO-VEGA, B.O.A.; LORENZO, S.L.; RUIZ, J.L. 2004. Effect of zeolitic products in the nutritive quality of the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Hicobiológica*, 14: 69-74.
- BARAJAS, F. J. M.; VILLEGAS, R. S.; CLARK, G. P.; MORENO, B. L. 2006. *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration. *Aquacult. Res.*, 37: 492-499.
- BAUMGARTEN, M.G.Z.; ROCHA, J.M.B.; NIENCHESKI, L.F.H. 1996. Manual de análises em oceanografia química, Ed. FURG, Rio Grande. 132p.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer, Norwell, MA. 700p.
- BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K.; DUNSTAN, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315–331.
- CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. 1996. Haemolymph osmolality, acid-base balance, and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* bates exposed to ambient nitrite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 151–155.
- COSTA R.; MERMOUD, I.; KOBLAVI, S. MORLET, B.; HAFFNER, P.; BERTHE, F. LEGROUMELLE, M.; GRIMONT, P. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164: 297-309.
- COUTTEAU, P., 1996. Micro-algae. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. 361: 7-48.
- DEFOIRD TOM, BOON NICO, BOSSIER PETER, VERSTRAETE WILLY. 2004. Disruption of bacterial Quorum sensing an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240: 69-88.
- DERNER, R.B. 2006. *Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas Chaetoceros muelleri e Thalassiosira fluviatilis, com ênfase no teor de graxos polinsaturados*. 158p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.
- D'SOUZA, F.M.L.; LONERAGAN, N.R. 1999. Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. *Mar. Biol.*, 133: 621–633.
- D'SOUZA, F.M.L.; KNUCKEY, R.M.; HOHMANN, S.; PENDREY, R.C. 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Nutr.*, 8: 113-120.
- EMMERSON, W.D. 1980. Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Mar. Biol.*, 58: 65 – 73.
- FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón (*Penaeus vannamei*) en América Latina. Roma. 66pp.
- GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; VELASCO-BLANCO, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*, 211: 43-48.
- HARRIS, L.; OWENS, L.; SMITH, S. 1996. A Selective and Differential Medium for *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3548-3550.
- HENKE, J.M.; BASSLER, B.L. 2004. Quorum sensing regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 186: 3794-3805.
- JAIME-CEBALLOS, B.J.; HERNANDEZ-ILAMAS, B.; GARCIA-GALANO, T.; VILLAREAL, H. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture*, 260: 215-220.
- JENSEN, L.V.; WASIELESKY, W.J.; BALLESTER, E.L.C.; CAVALLI, L.O.; SANTOS, M.S. 2006. Role of microalgae *Thalassiosira fluviatilis* in weight gain and survival of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* reared in indoor nursery tanks. *Nauplius*, 14: 37-42.
- KAIRESALO, T.; TUOMINEN, L.; HARTIKAINEN, H.; RANKINEN, K. 1995. The role of bacteria in the nutrient exchange between sediment and water in a flow-through system. *Microb. Ecol.*, 29: 129-144.
- KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I.; UMESHA, R.K. 2005. Microbial diseases in shrimp aquaculture. *Mar. Microb. Facets & Opportunities*; Ramaiah, N (Ed.), 121-134pp.
- KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect. Immun.*, 68: 4839-4849.
- LCM - Laboratório de Camarões Marinhos. Protocolo de Operações LCM-UFSC, LARVICULTURA / PO-4. Florianópolis/SC, 2007.3p.
- LIU, C.H.; CHEN, J.C. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shell-fish Immunol.*, 16: 321-334.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2004. Microbiologia de Brock. 10th ed, Upper Saddle River: Prentice Hall. 991p.
- MANFIELD, M.; HARRIS, L.; RICE, S.A.; NIS, R.; KJELLEBERG, S. 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2079-2084.
- MAUGERI, T.M.; CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C. 2000. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 261-266.
- MOURIÑO, J.L.; BUGLIONE, C.C.; VIEIRA, F.N.; TORO, C. R.; PEDROTTI, F. S. BELETTINI, F.; SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E. 2008a. Avaliação bacteriológica aplicada à produção de pós-larvas de *Penaeus vannamei*. *Atlântica*, 30: 9-16.
- MOURIÑO, J.L.; VINATEA, L.A.; BUGLIONE, C.C.; TORO, C.R.; VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F. S.; MARTINS, M.L.; DENNER, R.B.; AGUILAR, M.A.; BELTRAME, E. 2008b. Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Braz. J. Biol.* 68(1): 173-177.
- MUIR, P.R.; SUTTON, D.C.; OWENS, L. 1991. Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. *Mar Biol*, 108: 67–71.

- OLIVEIRA, A.; BELTRAME, E.; VINATEA, L. 1993. Efecto del uso individual de *Chaetoceros* sp. y *Thalassiosira fluviatilis* así como sus combinaciones con *Tetraselmis* sp. y *Tetraselmis tetrahele* en el crecimiento de larvas de *Penaeus schmitti*. *Anales del Simposio Brasileiro sobre cultivo de camarones*, p. 469-480.
- OSTRENSKY, A.; WASIELESKY JR., W. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pkrez-Farfante, 1967. *Aquaculture.*, 132: 339-347.
- PIÑA, P.; NIEVES, M.; RAMOS-BRITO, L.; CHAVIRA-ORTEGA, C.O.; VOLTOLINA, D. 2005. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture.*, 249: 431-437.
- PIÑA, P.; VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; ROBLES M. 2006. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. *Aquaculture.*, 253: 523– 530.
- ROBINSON, C.B.; SAMOCHA, T.M.; FOX, J.M.; GANDY, R.L.; MCKEE, D.A. 2005. The use of inert artificial commercial food sources as replacements of traditional live food items in the culture of larval shrimp, *Farfantepenaeus aztecus*. *Aquaculture.*, 245: 135-147.
- SALVESEN, I.; SKJERMO, J.; VADSTEIN, J. 1999. Growth of turbot *Scophthalmus maximus* L. during first feeding in relation to the proportion of rK-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture.*, 175: 337–350.
- Solorzano, L. 1977. Determination of ammonia in natural water by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14: 799–801.
- SOTO-RODRÍGUEZ, S. A.; SIMOES, N.; ROQUE, A.; GIL, B.G. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture.*, 258: 109-115.
- STRICKLAND, J. D H., PARSONS, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd edn. Bull. Fish Res. Bd. Can. 167: 1-310.
- THAITHONGNUM, S.; RATANAMA, P.; WEERADECHAPOL, K.; SUKHOOM, A.; VUDDHAKUL, V. 2006. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture.*, 261: 1-9.
- THOMPSON, F.L.; ABREU, P.C.; CAVALLI, R.O. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture.*, 174: 139-153.
- THOMPSON, F.L.; ABREU, P.C.; WASIELESKY, W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture.*, 203: 263-278.
- VALENTIN, J.L. 2000. Ecologia numérica: Uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Interciência, Rio de Janeiro. 117p.
- VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES AROZARENA, R.; RIVERA, G.; BOLLAND, A.; BALLADARES, M.; GÓMEZ-GIL, B.; CALDERÓN, J.; ZORRUELOS, P.; SWINGS, J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2592–2597.
- WRIGHT, P.A. 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. Review. *J. Exp. Biol.*, 198: 273-281.
- ZAR, J.H. 1996. Biostatistical analysis, 3rd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 662p.
- ZHAO, J.H.; LAM, T.J.; GUO, J.Y. 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda:Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquacult. Res.*, 28: 517-523

Recebido 16/05/2008

Aceito 04/02/2009