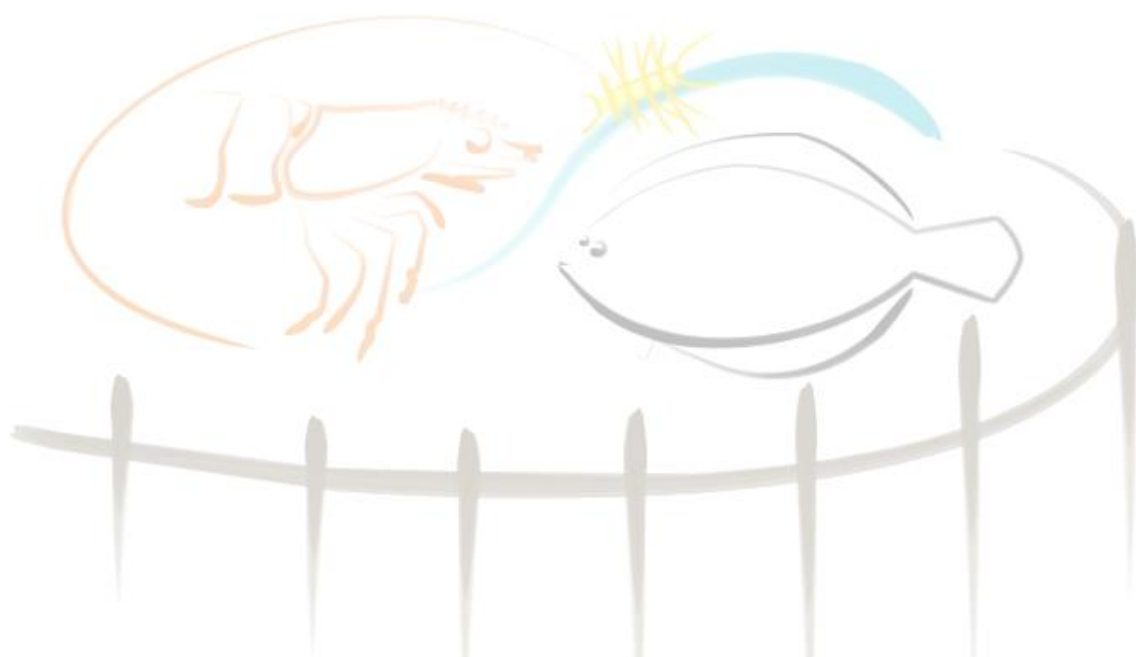




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROTÍFEROS *Brachionus plicatilis*
UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM E
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MICROALGA
Nannochloropsis oceanica

THIAGO PEDROSA ALMEIDA PADILHA DE OLIVEIRA

RIO GRANDE, RS

Fevereiro, 2019

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Avaliação da produção de rotíferos *Brachionus plicatilis* utilizando diferentes densidades de estocagem e diferentes concentrações de microalga *Nannochloropsis oceanica*

Thiago Pedrosa Almeida Padilha de Oliveira

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues

Coorientador: Dr. Fabio Felipe Gabriel Roselet

Rio Grande – RS, Brasil

Fevereiro de 2019

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
1. RESUMO GERAL	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUÇÃO GERAL	3
4. OBJETIVOS	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I: Evaluation of the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> production using different stocking densities and different concentrations of microalgae <i>Nannochloropsis oceanica</i>.	15
Abstract	16
1. Introduction	17
2. Material e Methods	18
3. Results	22
4. Discussion	29
6. References	32
CONCLUSÕES	36

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me apoiar em todos os momentos, me fazer capaz de encarar e triunfar sobre mais esse desafio.

Ao meu avô José Romeu, que durante esse período foi alegrar o cara lá de cima. “Ô cara”, te carrego no peito por onde eu for, você é o responsável por todas as minhas conquistas, foi você que me ensinou como encarar a vida e tirar o máximo proveito dela.

Aos meus pais, essa vitória não é só minha, é nossa. Foi somente graças a todos os momentos que passamos juntos em que me ensinaram tudo o que eu sei, e a todos os momentos que passamos separados em que me deram suporte ilimitado e inquestionável, que essa conquista foi possível. Amo vocês, sou profundamente grato por todos os sacrifícios que passaram para me criar como o homem que sou.

Aos meus irmãos de graduação, Pop, Japa, Med, Gi e Coisa, por serem a família que eu escolhi. Sem vocês a minha vida no Cassinão não teria graça.

Aos meus professores, que mesmo através de um árduo caminho, foram os responsáveis por grandes ensinamentos, dentro e fora de sala.

Ao pessoal da EMA, pelo acolhimento, conselhos, churrascos e boas risadas.

Ao Lucas Maltez, por todas as conversas, conselhos, discussões enfáticas e, principalmente, por essa amizade massa.

Ao meu orientador Ricardo Vieira, por toda a paciência, dedicação, puxões de orelha e ensinamentos.

Ao meu coorientador Fabio Roselet, por me ajudar a solucionar tantas dúvidas em uma área previamente desconhecida por mim.

À FURG e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, pela oportunidade de realizar o mestrado, e a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

1. RESUMO GERAL

A produção do rotífero *Brachionus plicatilis* é essencial para o desenvolvimento da larvicultura de peixes marinhos, uma vez que é comumente utilizado como primeiro alimento para as larvas. A microalga *Nannochloropsis oceanica* é uma fonte alimentar que pode ser utilizada na produção de rotíferos, no entanto a sua concentração deve ser conhecida juntamente com a densidade inicial de rotíferos a ser inicialmente estocada. O experimento realizado foi delineado a partir do modelo estatístico fatorial de Delineamento Composto Central Rotacional. O experimento foi realizado durante 72 horas e utilizou 11 unidades experimentais com volume útil de 2 L. Os rotíferos foram estocados em diferentes densidades (59, 100, 200, 300 e 341 rot mL⁻¹) e alimentados com diferentes concentrações de *N. oceanica* concentrada (59, 100, 200, 300 e 341 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ dia⁻¹). Após o período experimental, gráficos de superfície resposta foram gerados para os resultados de taxa de crescimento populacional, proporção de fêmeas ovadas, amônia não ionizada e custo. Ademais, utilizando perfiladores de predição, foram criados três cenários de produção com ênfase em situações cotidianas de uma produção de rotífero. O Cenário Otimizado, onde os resultados obtidos apresentam melhor interação, a melhor densidade de *N. oceanica* foi de 270 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ dia⁻¹ com uma densidade de estocagem de 69 rot mL⁻¹; para o Cenário de Manutenção, com quantidade de microalga e custo reduzido, a melhor densidade de *N. oceanica* foi de 140 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ dia⁻¹ com uma densidade de estocagem de 180 rot mL⁻¹; e Cenário de Produção Maximizada, com taxa de crescimento populacional maximizada (0,53), a melhor densidade de *N. oceanica* foi de 300 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ dia⁻¹ com uma densidade de estocagem de 100 rot mL⁻¹. Como conclusão, a utilização da microalga *N. oceanica* na concentração de 300 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ dia⁻¹ e com uma densidade de estocagem de rotíferos de 100 rot mL⁻¹, se apresenta como a melhor condição para a produção de rotíferos.

Palavras-chave: zooplâncton; fitoplâncton; piscicultura; Delineamento Composto Central Rotacional; Design de Experimentos

2. ABSTRACT

The production of *Brachionus plicatilis* rotifers is essential for the development of marine fish larviculture, since it is commonly used as the first food for larvae. The use of the microalga *Nannochloropsis oceanica* as food enables the rotifer large-scale production. To create a production protocol, the rotifer stocking density and the amount of feed used should be calculated according to the need for rotifers production. The experiment was delineated from the factorial statistical model of Central Composite Rotatable Design. The rotifers were stocked at different densities (59, 100, 200, 300 and 341 rot mL⁻¹) and fed with different amounts of concentrated *N. oceanica* (59, 100, 200, 300 and 341 × 10⁹ cell rot⁻¹ day⁻¹). After the experimental period, surface response graphs were generated for the results of population growth rate, proportion of egged females, unionized ammonia and cost. In addition, using prediction profilers, three production scenarios were created with an emphasis on daily situations of a rotifer production. The Optimum Scenario, where the results obtained showed better interaction, the best density of *N. oceanica* was 270 × 10⁹ cell 10⁶ rot⁻¹ day⁻¹ with a storage density of 69 rot mL⁻¹; for the Maintenance Scenario, with reduced microalgae quantity and cost, the best *N. oceanica* density was 140 × 10⁹ cell 10⁶ rot⁻¹ day⁻¹ with a stocking density of 180 rot mL⁻¹; and Maximized Production Scenario with maximized population growth rate (0.53), the best density of *N. oceanica* was 300 × 10⁹ cell 10⁶ rot⁻¹ day⁻¹ with a stocking density of 100 rot mL⁻¹. As a conclusion, the use of the *N. oceanica* at the concentration of 300 × 10⁹ cell 10⁶ rot⁻¹ day⁻¹ and with a *B. plicatilis* storage density of 100 rot mL⁻¹ is the best condition for rotifer production.

Keywords: zooplankton; phytoplankton; pisciculture; Central Composite Rotatable Design; Design of Experiments.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Com a estagnação da atividade pesqueira, a aquicultura vem apresentando grande crescimento nos últimos 30 anos (FAO, 2018). Com isso, novas técnicas e novas espécies estão sendo pesquisadas afim de potencializar a produção. Um dos grandes entraves da aquicultura marinha é a larvicultura das espécies produzidas, uma vez que nesta fase as larvas possuem alta suscetibilidade à patógenos e baixa resistência às variações físico-químicas. Além disso, neste período as larvas necessitam de alimentos que atendam suas exigências nutricionais, com tamanho adequado para a alimentação, fluuabilidade positiva e capacidade locomotora para estimular o comportamento predatório (Ferreira, 2009). Atualmente dentre os alimentos vivos utilizados na primeira alimentação de larvas de peixes marinhos, os rotíferos representam o grupo de zooplâncton mais utilizados no mundo (Zhang et al., 2017).

O Filo Rotífera é formado por organismos aquáticos invertebrados, pseudocelomados, não segmentados e com simetria bilateral, que compõe o grupo dos metazoários. Suas espécies podem habitar ambientes de água doce, marinha ou salobra (Dhert et al., 2001).

No Japão, até a década de 50, os integrantes do Filo Rotífera eram tidos como contaminantes na produção aquícola. Ito (1955) descreveu o *Mizukawari* (morte de fitoplâncton no verão), um fenômeno observado em criações de enguias no Japão, causado por uma repentina queda nos estoques de microalgas e redução do teor de oxigênio dissolvido nos tanques de cultivo. Esse fenômeno era causado devido ao crescimento descontrolado de rotíferos que encontravam ali um ambiente com condições ótimas para a sua reprodução, entretanto, quando toda a microalga era consumida, ocorria a morte dos rotíferos e sua decomposição causava uma abrupta queda de oxigênio dissolvido. No entanto, pesquisas posteriores, apontaram que algumas espécies do Filo apresentavam características ideais para serem utilizadas como alimento nos estágios iniciais das larvas, uma vez que apresentavam crescimento populacional acelerado, possibilidade de produção em pequenos espaços, tamanho compatível com a abertura da boca das larvas (40-200µm) e baixa velocidade natatória (Lubzens et al., 1989). Além disso, o hábito alimentar não-seletivo do filo, permite a realização da bioencapsulação, técnica de alimentação indireta, a qual utiliza bactérias, nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários às larvas, na alimentação dos rotíferos. Após

serem enriquecidos com esses nutrientes, os rotíferos “enriquecidos” são ofertados como alimento às larvas (Verpraet et al., 1992). Dentre as espécies desse Filo, se destaca a espécie *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) (Figura 1).



Figura 1 – Rotífero *Brachionus plicatilis*, com dois ovos, produzidos no Laboratório de Piscicultura Marinha e Estuarina - FURG (Foto do autor).

O rotífero *Brachionus plicatilis* possui um curto ciclo de vida. De acordo com Ferreira (2009), se mantidos em condições ótimas, podem sobreviver de 6 a 8 dias. Após sua eclosão, podem atingir o estado adulto em aproximadamente 18 horas. Ademais, suas fêmeas podem reproduzir até dez vezes ao longo do seu ciclo de vida, o que demonstra uma elevada capacidade reprodutiva e justifica o interesse do setor aquícola na espécie (Dhert, 2001).

Quanto ao ciclo de vida, o rotífero *B. plicatilis* possui dois modos de reprodução, assexuada e sexuada (Figura 2). A reprodução assexuada é a mais comum no cultivo intensivo de rotíferos para a larvicultura (Ferreira, 2009). Nesse modo, também chamado de via partenogênica, as fêmeas denominadas como amícticas formam ovos diplóides não fecundados, que irão originar novas fêmeas amícticas, possibilitando a continuidade da espécie. Já a reprodução sexuada pode ter início com a interrupção da via partenogênica, devido a fatores de origem exógena, tais como, temperatura, densidade populacional, alimentação, ou por fatores endógenos, como senescência (Lubzens and Zmora, 2003). Nesse

modo de reprodução, os ovos fecundados pelos machos, darão origem à ovos de resistência, que possuem córion espesso, tornando o ovo resistente às oscilações ambientais. Quando os fatores estressantes cessam, os ovos de resistência eclodem e a reprodução assexuada é reiniciada.

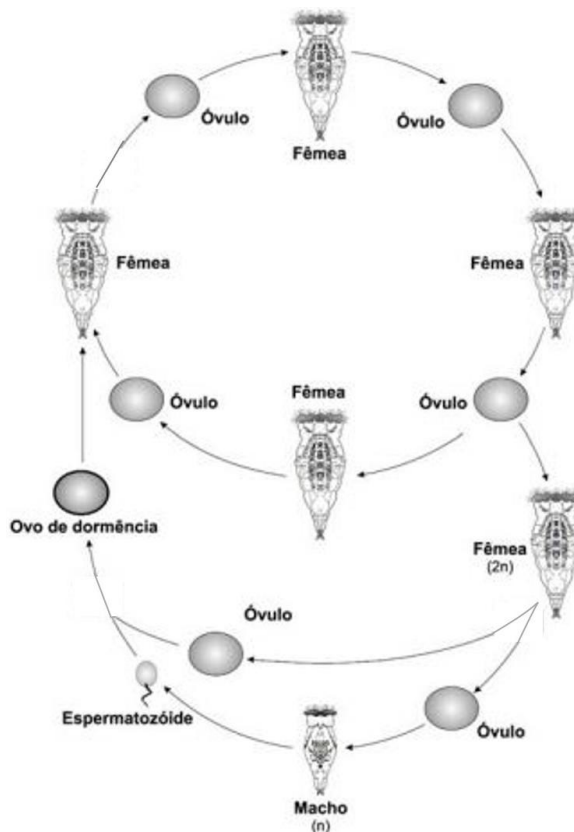


Figura 2 – Modos de reprodução do rotífero *Brachionus plicatilis*. (<https://www.examesnacionais.com.pt/exames-nacionais/11ano/2010-1fase/Biologia-Geologia.pdf>)

Por ser uma espécie eurihalina, cosmopolita, com rápido crescimento e de fácil produção (Kostopoulou et al., 2012), o rotífero *Brachionus plicatilis* vem sendo a espécie mais pesquisada e utilizada na aquicultura, além disso é utilizado como modelo para estudos ecotoxicológicos (Garaventa et al., 2010; Manfra et al., 2017). Os rotíferos também são considerados bioindicadores de eutrofização, uma vez que se alimentam de fitoplâncton, normalmente presente nesses ambientes ricos em nutrientes (Snell et al., 1989).

O desenvolvimento de pesquisas de produção de rotífero é essencial para a aquicultura, uma vez que quanto melhor desenvolvida a sua produção, maior será a oferta e a qualidade do alimento disponível para os estágios larvais dos organismos produzidos. Apesar dos rotíferos possuírem hábito alimentar não-seletivo, o alimento consumido está diretamente relacionado com sua taxa de reprodução e consecutivo aumento da população (Tamaru et al., 1993). Um dos alimentos mais utilizados para a produção em laboratório de rotíferos são as microalgas, que constituem grande parte de sua dieta em ambiente natural e possuem uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, que propiciam maiores taxas de crescimento e reprodução (Rahman et al., 2018). Vários gêneros de microalgas já foram utilizados, com sucesso, como alimento para rotíferos, dentre eles se destacam: *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros*, *Rhodomonas* e *Isochrysis* (Dhert et al. 2001; Hoff and Snell 2001; Treece and Davis 2000; Wikfors and Ohno, 2001).

No estudo de Bae e Hur (2011) foram testadas seis espécies de microalgas utilizadas como alimento para rotíferos, como resultado a microalga *N. oceanica* obteve a segunda melhor taxa de produção de rotíferos (0,66), ficando atrás apenas da microalga *Nannochloropsis sp.* (0,68) e estatisticamente semelhante a taxa de produção utilizando a *N. oculata*. Atualmente as espécies, *Nannochloropsis sp.* e *N. oculata*, são as microalgas mais utilizadas para a produção de rotíferos e já se conhece suas concentrações ótimas para a criação de rotíferos. No entanto, ainda existe uma carência de informações para a produção de rotíferos utilizando a microalga *Nannochloropsis oceanica*.

A microalga *Nannochloropsis oceanica* possui células esféricas pequenas (2-4 μm), altas taxas de crescimento, ampla tolerância à parâmetros físico-químicos, alta concentração lipídica (até 50% do seu peso seco, dos quais 24% é referente ao ácido eicosapentaenoico - EPA) e elevada resistência à contaminação biológica (Moazami et al., 2012). Entretanto, para ser utilizada como alimento, de modo que não altere significativamente o volume da produção de rotíferos, as microalgas devem ser ofertadas aos rotíferos na forma concentrada. Além disso o processo de concentração da microalga possibilita o seu armazenamento sob refrigeração e sua utilização durante um período mais longo (Welladsen et al., 2014). Algumas empresas já comercializam diferentes concentrados de microalgas, porém são

produtos ainda inexistentes no mercado nacional e que necessitam serem importados, conferindo um alto custo para a utilização do produto.

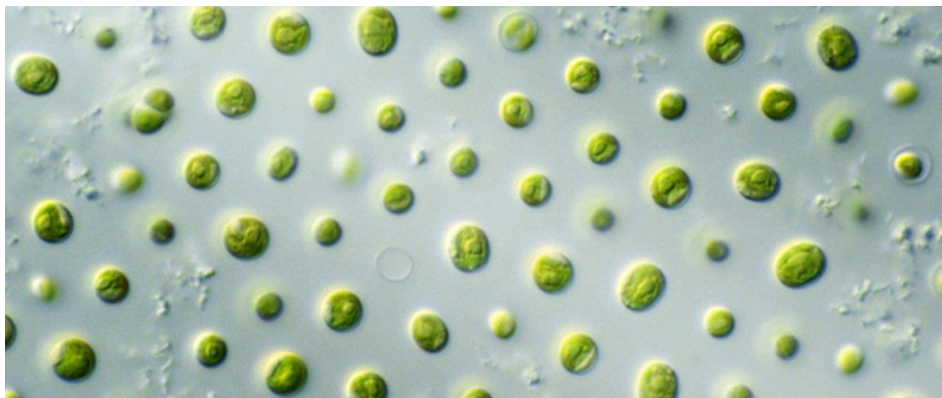


Figura 3 - Células da microalga marinha *N. oceanica* (<https://phys.org/news/2018-05-dna-toolkit-alga-nannochloropsis.html>)

É de fundamental importância se estabelecer a concentração ideal da espécie de microalga utilizada como alimento para os rotíferos. Através da concentração de microalga ideal, é possível minimizar custos e maximizar a produção de rotíferos. Além disso, é necessário manter o ambiente de cultivo em condições adequadas, sobretudo em termos de qualidade de água, uma vez que se a oferta de microalgas exceder as taxas de alimentação da população, ocorrerá decomposição e consequente diminuição do oxigênio dissolvido e aumento dos níveis de nitrogenados. De acordo com De Araujo et al. (2000), níveis críticos de amônia não ionizada podem ser prejudiciais à produção de rotíferos, afetando sua capacidade reprodutiva e seu tempo de vida. Quanto a *N. oceanica* não se conhece a concentração adequada que deve ser ofertada aos rotíferos para sua produção.

Além da quantidade e qualidade do alimento fornecido, a densidade de estocagem de rotíferos, pode interferir na sua taxa de reprodução e na população final. Yoshinaga et al. (1999), observou que rotíferos produzidos em densidades maiores, produzem ovos em estágio mais jovem do que os produzidos em densidades menores, apresentando maior taxa de crescimento populacional. Em contraste, Sterzel e Snell (2003) obtiveram resultados confirmando a hipótese de que a espécie *Brachionus plicatilis* é induzida a iniciar sua reprodução sexuada em ambientes com alta concentração populacional, diminuindo assim suas taxas de reprodução assexuada. Além disso não há uma conformidade entre as

densidades iniciais utilizadas em estudos de produção de rotíferos. Bae e Hur (2011) utilizaram 10 rot mL⁻¹ como densidade inicial de rotíferos, Lubzens et al. (1995), utilizaram 60 rot mL⁻¹, já Yamasaki et al. (1989) utilizaram 100 rot mL⁻¹. Em vista disso, para se obter um protocolo de produção de rotíferos, é necessário estabelecer densidades de estocagem ideais para o inóculo da produção.

Durante o período em que não há atividade de desova ou larvicultura, ainda existe a necessidade de manter uma população saudável de rotíferos, que será utilizada como inóculo, no momento em que a demanda por rotíferos iniciar. Existe uma escassez de estudos sobre esse período de manutenção, uma vez que não há valores de quantidade ideal de alimento ou população necessária para obter um rápido escalonamento da produção. Informações sobre esse período possibilitará planejar os fatores necessários para iniciar o escalonamento da produção e reduzir custos de períodos em que não há demanda por rotíferos.

Para a elaboração concisa de um protocolo de alimentação de rotíferos utilizando *N. oceanica*, juntamente com a variação da densidade de estocagem de *B. plicatilis*, é possível utilizar o método estatístico de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Box and Wilson, 1951). Esse método é comumente utilizado nas indústrias farmacêutica e química, uma vez que permite a otimização de processos de produção através de delineamentos de tratamentos complexos (Mateus, 2001). Na aquicultura, experimentos utilizando o DCCR ainda são escassos, no entanto pode-se destacar alguns trabalhos relacionados com a produção de fitoplâncton (Spolaore et al., 2006; Imamoglu et al., 2015) e até mesmo na produção de rotíferos do gênero *Habrotrocha sp.* (Mu et al., 2011). Apesar de pouco utilizado, o DCCR apresenta grande potencial para a área da aquicultura, pois realiza a correlação entre os fatores estudados e reduz a quantidade de unidades experimentais, diminuindo-se o custo e o número de organismos vivos que necessitam ser utilizados nos experimentos.

A utilização do DCCR permite a obtenção de uma superfície de resposta através do Método de Superfície de Resposta (MSR), uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais, que permite a correlação entre variáveis utilizando uma menor quantidade de unidades experimentais (Asghar et al., 2014). Esse método também possibilita o cálculo do erro padrão e pode inferir qual a melhor combinação dos fatores selecionados.

Além disso, a simulação de cenários cotidianos da produção de rotíferos e a previsão de produtividade são outras vantagens da utilização desse modelo.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a produção de *B. plicatilis* com variações de densidades de estocagem e alimentado com diferentes concentrações de *N. oceanica*, utilizando a metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional.

Objetivos Específicos

- a) Avaliar as taxas de reprodução de rotíferos utilizando diferentes concentrações de *N. oceanica* e diferentes densidades populacionais iniciais.
- b) Estipular a melhor concentração de *N. oceanica* para maximizar a produção de *B. plicatilis*.
- c) Averiguar a influência da densidade inicial de *B. plicatilis* junto ao crescimento populacional da espécie.
- d) Estipular as melhores densidades iniciais de *B. plicatilis* junto com as melhores concentrações de *N. oceanica* para cenários de produção recorrentes em larviculturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASGHAR, A., RAMAN, A., AZIZ, A., DAUD, W. M. A. W. 2014. A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process. *The Scientific World Journal*, 2014: 86912.
- BAE, J. H., HUR, S. B. 2011. Selection of suitable species of *Chlorella*, *Nannochloris*, and *Nannochloropsis* in high-and low-temperature seasons for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(4): 323-332.
- BOX G.E.P., WILSON K.B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J R Stat Soc, Ser B Stat Meth*, 13: 1-45.
- DE ARAUJO, A. B., SNELL, T. W., HAGIWARA, A. 2000. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Research*, 31(4): 359-365
- DHERT, P., ROMBAUT, G., SUANTIKA, G., SORGELOOS, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2): 129-146.
- FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture - SOFIA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Disponível em 28 de novembro de 2018 em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>
- FERREIRA, P. M. P. 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP, v. 235.
- GARAVENTA, F., GAMBARDELLA, C., DI FINO, A., PITTORE, M., FAIMALI, M. 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology*, 19(3): 512-519.
- HOFF, F. H.; SNELL, T. W. 2001. Microalgae culture. Em: *Plankton Culture Manual*. 5th ed. Florida Aqua Farms Inc., Dade City. p.27-59.

- IMAMOGLU, E., DEMIREL, Z. CONK DALAY, M. 2015. Process optimization and modeling for the cultivation of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis striata* via response surface methodology. *Journal of Phycology*, 51: 442-453.
- ITO, T. 1955. Studies on the 'Mizukawari' in eel-culture ponds I. The feeding activity of *Brachionus plicatilis*. *Rep. Fac. Fish. Univ. Mie*, 2: 162-167.
- KOSTOPOULOU, V., CARMONA, M. J., DIVANACH, P. 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. *Journal of Biological Research*, 17: 97-112.
- LUBZENS, E., ZMORA, O. 2007. Production and Nutritional Value of Rotifers. Em: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds J. G. Støttrup and L. A. McEvoy). Blackwell Science, Oxford. 17-52.
- LUBZENS, E. ZMORA, O. BARR, Y. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. Em: *Rotifera IX*. Springer, Dordrecht. 337-353.
- LUBZENS, E., GIBSON, O., ZMORA, O., SUKENIK, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133(3-4): 295-309.
- LUBZENS, E., A. TANDLER, G. MINKOFF. 1989. "Rotifers as food in aquaculture." *Hydrobiologia*, 186(1): 387-400.
- MANFRA, L., ROTINI, A., BERGAMI, E., GRASSI, G., FALERI, C., CORSI, I. 2017. Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 557-563.
- MATEUS, N. B., BARBIN, D., CONAGIN, A. 2001. Viabilidade de uso do delineamento composto central. *Acta Scientiarum Technology*, 23: 1537-1546.

- MOAZAMI, N., ASHORI, A., RANJBAR, R., TANGESTANI, M., EGHTESEADI, R., NEJAD, A. S. 2012. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, 39: 449-453.
- MU, L., CAO, L., YU, F., LU, C., SHEN, C., HUANG, X., DING, G. 2011. Optimization of culture condition of *Habrotrocha sp.* by using response surface method. Em: Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE), 2011 International Conference. 1396-1398.
- RAHMAN, A. R. A., COB, Z. C., JAMARI, Z., MOHAMED, A. M., TODA, T., ROSS, O. H. 2018. The effects of microalgae as live food for *Brachionus plicatilis* (Rotifer) in intensive culture system. *Tropical Life Sciences Research*, 29(1): 127.
- SANDNES, J. M., KÄLLQVIST, T., WENNER, D., GISLERØD, H. R. 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 17(6): 515-525.
- SNELL, TERRY W., GUIDO P. 1989. "Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*." *Aquatic Toxicology*, 14(1): 65-80.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. 2006. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(6): 1049–1056.
- STELZER, C. P., SNELL, T. W. 2003. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology and Oceanography*, 48(2): 939-943.
- TAMARU, C. S., MURASHIGE, R., LEE, C. S., AKO, H., SATO, V. 1993. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata* and their effect on the

growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture*, 110(3-4): 361-372.

TREECE, G. D., DAVIS, D. A. 2000. Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. Southern Regional Aquaculture Center Publication, 701: 1-7.

VERPRAET R., CHAIR M., LEGER P., NELIS H., SORGELOOS P., DELEENHEER A. 1992. Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia nauplii*. *Aquacultural Engineering*, 11: 133-139.

WELLADSEN, H., KENT, M., MANGOTT, A., LI, Y. 2014. Shelf-life assessment of microalgae concentrates: effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. *Aquaculture*, 430: 241-247.

WIKFORS, G. H., OHNO, M. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *Journal of Phycology*, 37(6): 968-974.

YAMASAKI, S., TANABE, K., HIRAM, H. 1989. Efficiency of chilled and frozen *Nannochloropsis sp.* (marine *Chlorella*) for culture of rotifer. *Mem. Fat. Fish. Kagoshima Univ.*, 38: 77-82.

YOSHINAGA, T., HAGIWARA, A., TSUKAMOTO, K. 1999. Effect of conditioned media on the asexual reproduction of the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 412: 103-110.

ZHANG, H., BRÖNMARK, C., HANSSON, L. A. 2017. Predator ontogeny affects expression of inducible defense morphology in rotifers. *Ecology*, 98(10): 2499-2505.

CAPÍTULO I

Evaluation of the rotifer *Brachionus plicatilis* production using different stocking densities and different concentrations of microalgae *Nannochloropsis oceanica*

Este artigo está formatado de acordo com as normas da revista Aquaculture.

Abstract

The production of *Brachionus plicatilis* rotifers is essential for the development of marine fish larviculture, since it is commonly used as the first food for larvae. The use of the microalga *Nannochloropsis oceanica* as food enables the rotifer large-scale production. To create a production protocol, the rotifer stocking density and the amount of feed used should be calculated according to the need for rotifers production. The experiment was delineated from the factorial statistical model of Central Composite Rotatable Design. The rotifers were stocked at different densities (59, 100, 200, 300 and 341 rot mL⁻¹) and fed with different amounts of concentrated *N. oceanica* (59, 100, 200, 300 and 341 × 10⁹ cell rot⁻¹ day⁻¹). After the experimental period, surface response graphs were generated for the results of population growth rate, proportion of egged females, unionized ammonia and cost. In addition, using prediction profilers, three production scenarios were created with an emphasis on daily situations of a rotifer production. As conclusion, in order to obtain a maximized population growth rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* (0.53), it is recommended to use a *N. oceanica* concentration of 300 × 10⁹ cel 10⁶ rot⁻¹ day⁻¹ and a stocking density of rotifers of 100 rot mL⁻¹.

Key-words: zooplankton; phytoplankton; Central Composite Rotatable Design; Design of Experiments.

1. Introduction

The main bottleneck during the production of marine fish is the larviculture, especially the size and nutritional aspects of the organisms used as live food (Ferreira, 2009). The rotifer *Brachionus plicatilis* is the most common zooplankton used as first feeding of the larvae due to several adequate characteristics, such as compatible size with the larvae mouth, fast growth, high salinity tolerance, slow swimming velocity and are non-selective feeders (Lubzens et al., 1989; Verpraet et al., 1992). The reproduction rate and consecutive population growth of rotifers are directly related to the food consumed (Tamaru et al., 1993).

The microalga *Nannochloropsis oceanica* has small spherical cells (2-4 μm), high tolerance to physical-chemical parameters, high lipid concentration (approximately 50% of its dry weight, of which 24% is EPA) and high resistance to biological contaminations during the culture process (Moazami et al., 2012). Thereby, this microalga specie can be used as food to rotifers, however its recommended concentration is yet unknown.

Besides the quality and quantity of food offered, the rotifers population density, in the moment of stocking, can interfere in the reproduction rate and in the final population growth. Yoshinaga et al. (1999) observed that rotifers produced at higher densities can produce eggs at a younger stage than those produced at lower densities. However, Sterzel and Snell (2003) observed results confirming the hypothesis that the *Brachionus plicatilis* is induced to initiate sexual reproduction in high densities, reducing the asexual reproduction rate. Therefore, in order to estimate the rotifer production and the use of microalga, it is necessary to evaluate ideal stocking densities of the rotifers to optimize their production.

The production of rotifers in marine fish hatcheries is really common, nevertheless, the demand of rotifer is limited to the periods of larviculture. During the period when there is no spawning or no larviculture activity, which can be a longer period than the opposite, there is a need to maintain a healthy population, to be used as inoculating strain when the rotifers demand starts. Thereby, there is a necessity of studies about this situation, in order to produce only the necessary amount of rotifer to maintain the population, reducing expenses and unnecessary work.

To establish a rotifer feeding protocol using *N. oceanica*, considering the stocking density variation of *B. plicatilis*, it is proposed the use of the factorial statistic model of Central Composite Rotatable Design (CCRD) (Box and Wilson, 1951). This statistical model is frequently used in researches of Phytopathology, Virology, Entomology and the chemical industry, since it allows the design of complex treatments (Mateus, 2001). In aquaculture, experiments using CCRD are yet scarce, however there are some research with microalgae production (Spolaore et al., 2006; Imamoglu et al., 2015) and even in the rotifer production of the genus *Habrotrocha sp.* (Mu et al., 2011). The CCRD presents great potential for aquaculture, as it allows to obtain the Response Surface Method (RSM), an optimization technique based on factorial planning that allows the correlation among variables, using a smaller number of experimental units, decreasing the number of living organisms that need to be used in the experiments (Asghar et al., 2014). In addition, the simulation of daily rotifer production scenarios and productivity prediction are other advantage to use this model. Thus, the aim of the present study is to determine the optimal growth of rotifers using *N. oceanica* as food source in different stocking densities of *B. plicatilis* and, thence, establish different productions scenarios.

2. Material e Methods

The experiment was conducted at Laboratory of Marine Fish Culture of Federal University of Rio Grande – FURG, located at Rio Grande, southern Brazil. Two independent variables were tested: different concentrations of *N. oceanica* (X_1) and *B. plicatilis* stocking densities (X_2). The microalga concentration in this study was determined using a pretest (Figure 1), in which rotifers *B. plicatilis* were fed with different concentrations of *N. oceanica* during 72 hours, with the same initial stocking densities of 200 rotifers mL⁻¹ (standard stocking density used in the laboratory for rotifer production). The better population growth rate and egged females were obtained with the concentration of 220×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹. Therefore, a close concentration of *Nannochloropsis oceanica*, 200×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹, was used to stablish the concentrations (central point) used in this experiment.

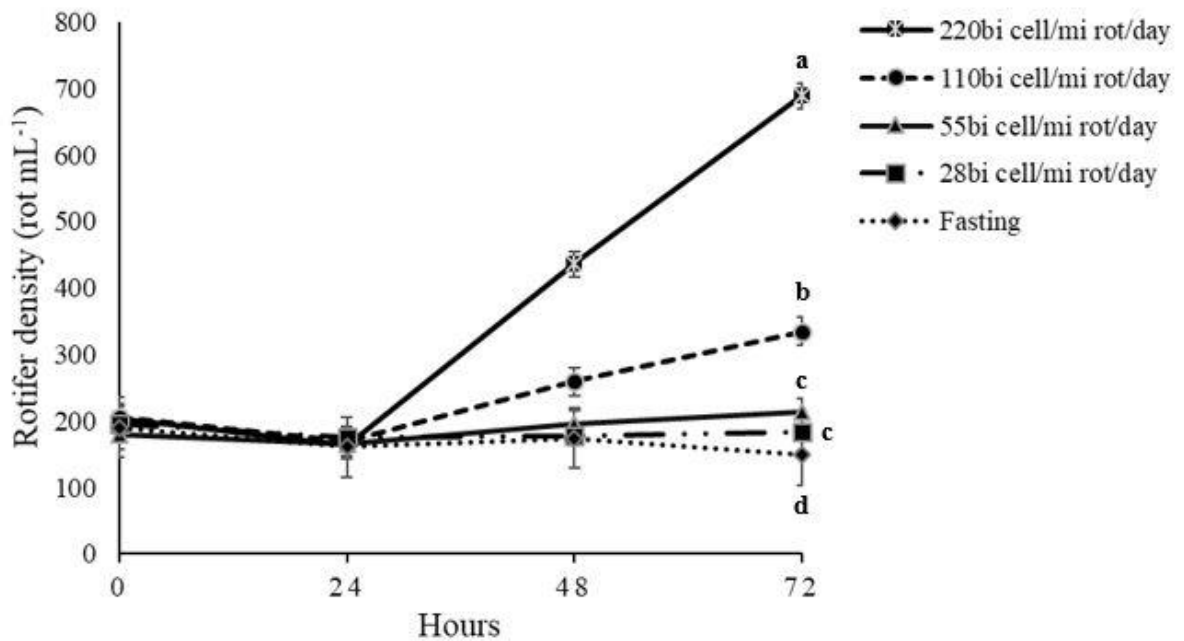


Figure 1 – Growth of rotifers during 72 h using different concentration of *N. oceanica*. Different letters close to the lines mean significantly difference ($P < 0.05$).

The experiment was designed by a factorial statistic model of Central Composite Rotatable Design (CCRD) 2^2 , using the software JMP[®]14 (SAS Institute Inc., USA), containing 2 star, 1 central and 2 axial points of each independent variable (Table 1). Through this method it was established that the experiment would be realized in 11 experimental runs (Table 2).

Table 1 - Statistical points of independent variables design to use the Central Composite Rotatable Design.

Independent variables	Star point	Axial point	Central point	Axial point	Star point
	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
<i>N. oceanica</i> ($\times 10^9$ cell 10^6 rot $^{-1}$ day $^{-1}$)	59	100	200	300	341
<i>B. plicatilis</i> stocking densities (rot mL $^{-1}$)	59	100	200	300	341

*The α value was determined by the number of independent variables ($n=2$), as shown in the Equation 1:

$$\alpha = (2^n)^{\frac{1}{4}} = 1,414 \quad (1)$$

Table 2 – Experimental arrangement used during the experiment.

Run	Factors	
	<i>N.oceanica</i> ($\times 10^9$ cell 10^6 rot $^{-1}$ day $^{-1}$)	<i>B. plicatilis</i> stocking densities (rot mL $^{-1}$)
1	59	200
2	100	100
3	100	300
4	200	59
5	200	200
6	200	200
7	200	200
8	200	341
9	300	100
10	300	300
11	341	200

The rotifers used in the experiment were collected in the maintenance tank of the laboratory, where they were kept in three 50 L fiber cylinder-conical tanks. The water quality was kept at 24 – 25 °C, salinity 25 and continuous aeration and illumination. The rotifers were fed with 0.6 g of baker`s yeast 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹, being produced through the Batch System (Lubzens, 1987). Previously to the experiment, the rotifers were acclimated in the same experimental physical-chemical conditions and fed with *N. oceanica* in the same concentrations of the experiment for 72h. This acclimatization period was performed to assure the exclusive influence of the *N. oceanica* in the rotifer population growth rate, excluding any stressors such as changes in food quality or concentration. At the end of the acclimatization period, they were washed with salt water, previously chlorinated and dechlorinated, and densities were adjusted accordingly to the experimental design.

The microalga *N. oceanica* was cultivated at Microalgae Production Laboratory of Federal University of Rio Grande – FURG, in a 1000 L raceway inside a greenhouse using half of the concentrations used in the F culture method, according to Guillard (1975). After the cultivation period, the microalgae volume was collected and centrifuged, using a refrigerated centrifuge (Hanil BioMed Inc., SUPRA 22K, Korea), during 10 minutes at 9000 rpm and 15 °C. During the experiment, the final centrifuged volume was diluted until it reaches a density of 22.5×10^9 cell mL⁻¹, to enable the use of microalgae without significantly change the culture volume. During the experiment the microalga was kept refrigerated at 4 °C.

The cost of microalga was calculated to obtain an average cost of the production. To establish this value, was used an average of two commercial microalgae. The first, Nanno 3600® of Reed Mariculture Inc. and the second, Nannochloropsis Algae Paste® of Brine Shrimp Direct Inc. The average price calculated was \$ 10.65 for each 10×10^9 cell of *Nannochloropsis*.

The experiment was conducted in 2 L experimental units with constant aeration, photoperiod 24:0 and duration of 72 hours. The physical-chemical parameters were maintained as follows: temperature (22.78 ± 0.1 °C), dissolved oxygen concentration (6.45 ± 0.28 mg L⁻¹), salinity (25.23 ± 0.24), pH (7.62 ± 0.09) and nitrite (0.43 ± 0.26 mg L⁻¹). The

feed was fractionated in five, and offered throughout the day (8:00, 12:00, 16:00, 20:00 e 24:00). The daily routine was composed in measuring the physical-chemical parameters as temperature and dissolved oxygen (oximeter, YSI, 550A, USA), salinity with a digital refractometer (ATAGO, PAL-06S, Japan), pH (METTLER TOLEDO, Five Easy FE20, USA), alkalinity was determined by titrimetry (Eaton et al., 2005), total ammonia with method described in UNESCO (1983), unionized ammonia with method described in Colt and Huguenin (2002) and nitrite accordingly Bendschneider and Robinson (1952). Besides that, 5 mL of culture were taken from each tank, to estimate the total number of rotifers, egged female proportion and population growth. Due to the variation of rotifer stocking densities among experimental units, the equation below was used to express the population growth rate:

$$\mu = (\log_e N_t - \log_e N_o) / t \quad (2)$$

Where μ is equal to population growth rate; N_t is final rotifer density; and N_o is rotifer stocking density.

The counting procedure was determined using a Sedgewick-Rafter counting chamber with a Lugol's iodine drop to immobilize the rotifers, with a microscope with a 10× objective and two mechanical counters, one for the number of egged females and other for the number of rotifers.

The collected data was analyzed by the software JMP[®]14. A Pareto chart was used to determine if the variables tested were statistically significant for the experiment, with a significance level (p -value) of 0.05. Besides that, an analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the statistical parameters and evaluate the prediction of the mathematic model.

3. Results

The model generated was considered predictive by analysis of variance (ANOVA), since it showed a satisfactory coefficient of determination ($R^2 = 0.91$). Thus, this model was utilized to construct contour plots, showing the values of predicted rotifer production for each condition under study.

The highest rotifer final density (1153 rot mL⁻¹) was obtained using a stocking density of 300 rot mL⁻¹ and a concentration of 300×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* (Table 3). However, the highest rotifer growth rate (μ) was found using a stocking density of 200 rot mL⁻¹ and a concentration of 341×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* (Figure 2).

Table 3 – Final rotifer density produced with different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and different *Brachionus plicatilis* stocking densities.

Run	Factors		Rotifer final density (rotifers mL ⁻¹)
	<i>N.oceanica</i> ($\times 10^9$ cell 10^6 rot ⁻¹ day ⁻¹)	<i>B. plicatilis</i> stocking densities (rot mL ⁻¹)	
1	59	200	411
2	100	100	187
3	100	300	658
4	200	59	204
5	200	200	717
6	200	200	678
7	200	200	718
8	200	341	1128
9	300	100	434
10	300	300	1153
11	341	200	987

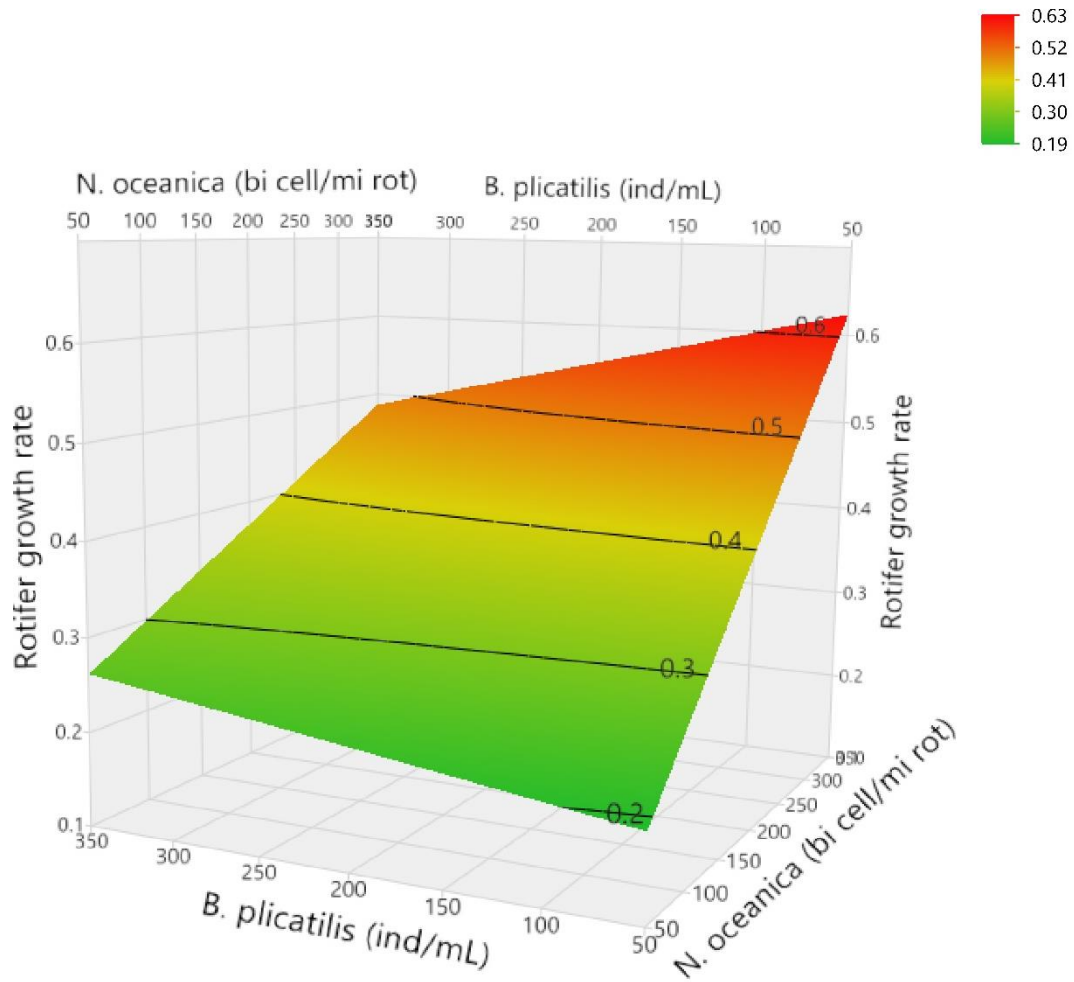


Figure 2 – Surface area response to the rotifer population growth rate (μ) produced with different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and different *Brachionus plicatilis* stocking densities.

During the experiment the egged female proportion ranged from 12.9% to 58.7%. The highest average egged female proportion was observed using 200×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* and stocking density of 59 rot mL⁻¹ (Figure 3). The egged female proportion increased in higher *N. oceanica* concentrations, in contrast it was lower in high rotifer stocking densities.

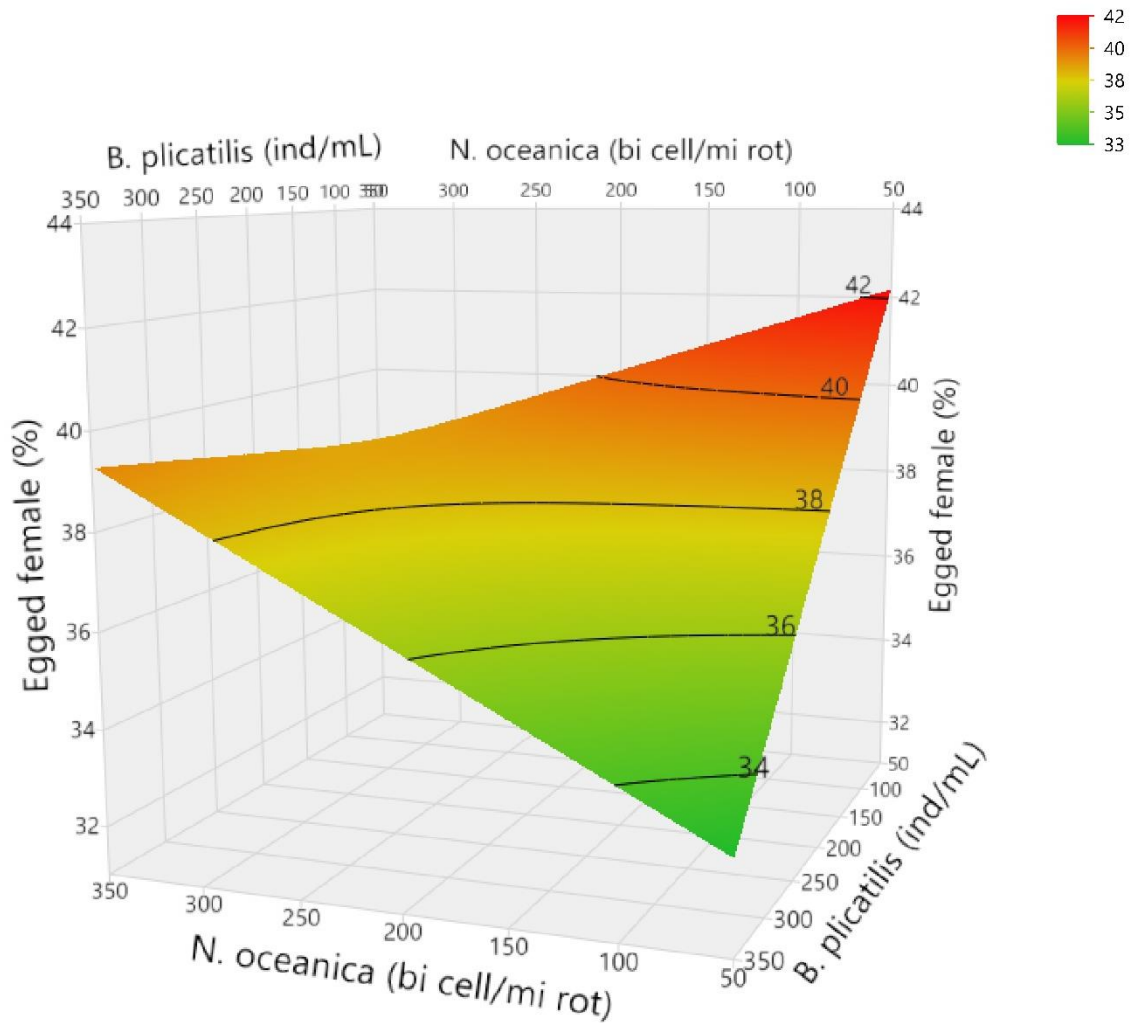


Figure 3 – Average proportion of egged females in relation to total rotifer density, using different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and different *Brachionus plicatilis* stocking densities.

The higher unionized ammonia concentration was $0.46 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$, observed using $200 \times 10^9 \text{ cells } 10^6 \text{ rotifers}^{-1} \text{ day}^{-1}$ of *N. oceanica* and a stocking density of 341 rot mL^{-1} , as can be observed in Figure 4.

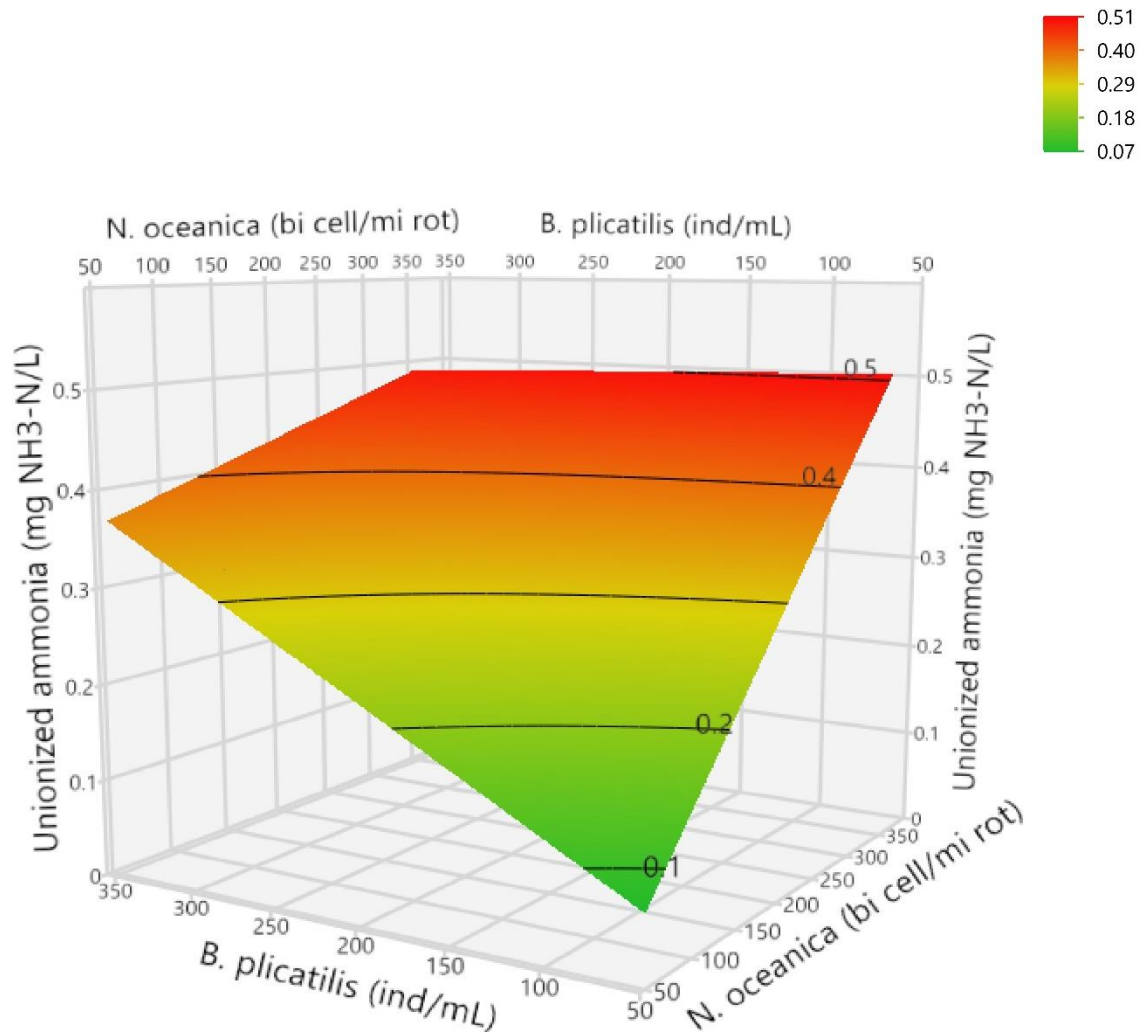


Figure 4 – Surface area response to the unionized ammonia ($\text{mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$) concentration in the last day of production with different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and in different *Brachionus plicatilis* stocking densities.

The production costs increase proportionally to the concentration of *N. oceanica* used in the production, as shown in Figure 5. Thus, the most expensive treatment was observed using 341×10^9 cells 10^6 rotifers $^{-1}$ day $^{-1}$ of *N. oceanica* and with a stocking density of 200 rot mL $^{-1}$, costing \$ 1,65.

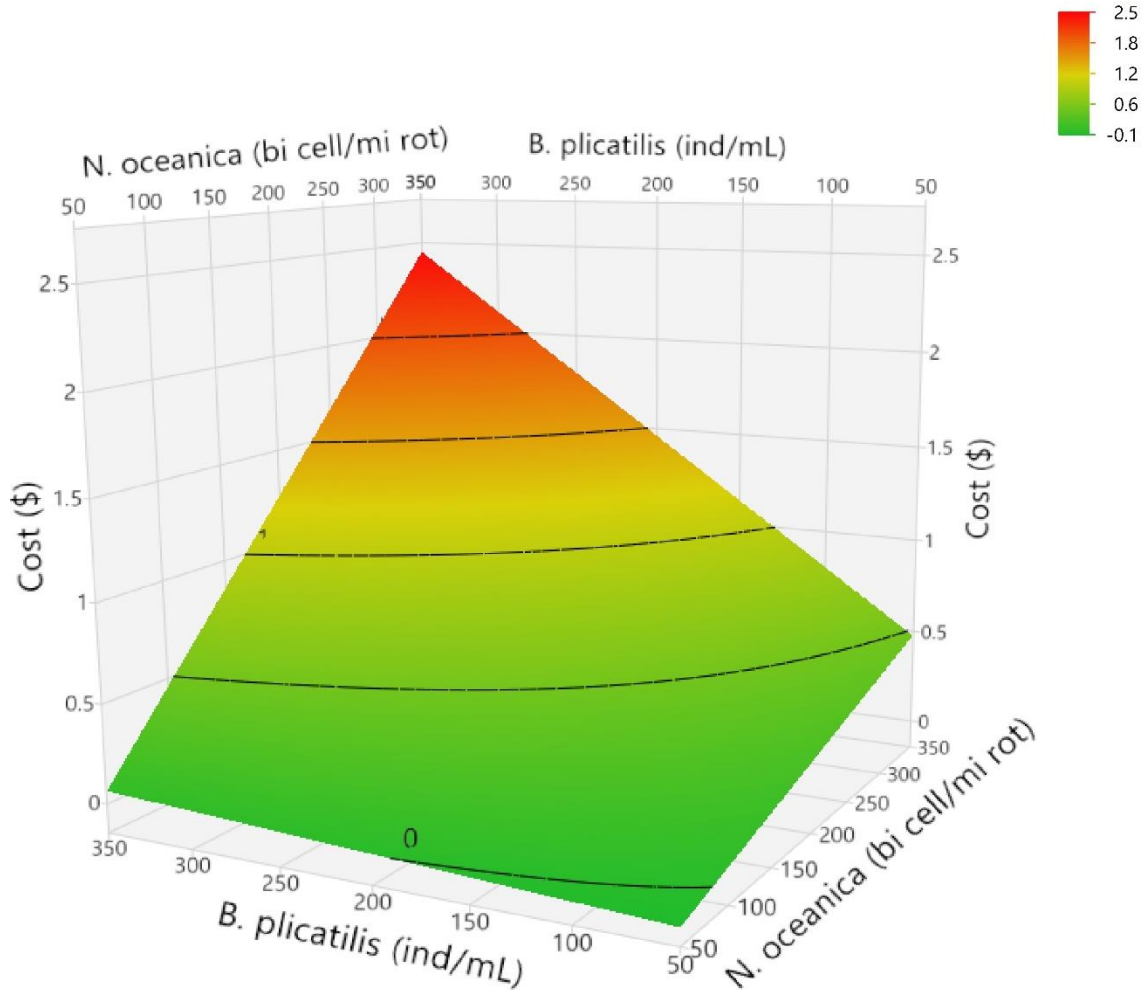


Figure 5 – Surface area response to the cost (\$) of *N. oceanica* in the rotifer production with different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and in different *Brachionus plicatilis* stocking densities.

All the variables and its interactions used to design the experiment was relevant (LogWorth > 2) and significant (ρ -value < 0.05). However, the most relevant variable was the concentration of *N. oceanica* used to fed the rotifers (LogWorth 5.368) as shown in the Pareto chart (Figure 6).

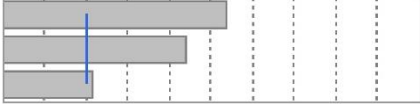
Variables	LogWorth		PValue
N. oceanica (bi cell/mi rot)(100,300)	5.368		0.00000
B. plicatilis (ind/ml)(100,300)	4.410		0.00004
N. oceanica (bi cell/mi rot)*B. plicatilis (ind/ml)	2.167		0.00681

Figure 6 – Significance and relevance of the studied variables to the obtainment of the prediction profile.

Three different prediction profilers were built using all factors and its interactions, except the average egged female proportion, which had a low correlation ($R^2 = 0.18$). The Optimized Scenario (OS), with maximized desirability, was obtained using a stocking density of 69 rot mL⁻¹ and feeding the rotifers with 270×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica*. The Maintenance Scenario (MS), with a median growth rate (0.31) and reduced cost (\$ 0.33), was obtained using a stocking density of 160 rot mL⁻¹ and 135×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica*. The Production Scenario (PS), with a maximized rotifer growth rate (0.53) was obtained using a stocking density of 100 rot mL⁻¹ and 300×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* (Table 4).

Table 4 – Different rotifers productions scenarios, created by prediction profilers, using different concentrations of *Nannochloropsis oceanica* and different *Brachionus plicatilis* stocking densities, as variables. The results were based in the interactions among responses of population growth rate (μ), unionized ammonia (mg NH₃-N L⁻¹) and cost (\$).

		Optimized Scenario (OS)	Maintenance Scenario (MS)	Production Scenario (PS)
Variables	<i>N.oceanica</i> ($\times 10^9$ cell 10^6 rot ⁻¹ day ⁻¹)	270	135	300
	<i>B. Plicatilis</i> stocking densities (rot mL ⁻¹)	69	160	100
Results	Rotifer population growth rate (μ)	0.50	0.32	0.53
	Unionized ammonia (mg NH ₃ -N)	0.39	0.27	0.44
	Cost (\$)	0.43	0.33	0.66
	Desirability*	0.75	0.48	0.74

* When multiple responses are used in a prediction profiler, an overall desirability function is constructed and optimized. The overall desirability for all responses is defined as the geometric mean of the desirability functions for the individual responses.

4. Discussion

The microalgae genus *Nannochloropsis* is commonly cultivated in fish hatcheries as feed for rotifers (Lubzens et al., 1995). Nonetheless, specific studies with *N. oceanica* as rotifers food are yet scarce. The present study confirmed that this species can be really effective in rotifers production, reaching a high population growth rate of 0.53, in the production scenario. Bae and Hur (2011), also demonstrated the *N. oceanica* efficiency in

the rotifer production, achieving a population growth rate of 0.66 using an stocking density of 10 rot mL⁻¹ and an experimental time of 5 days. Therefore, these results demonstrate that the use of *N. oceanica* can promote good rotifer population growth rate, even if compared with other studies using different microalgae. Yamasaki et al. (1989) using *Nannochloropsis sp.* achieved a rotifer population growth rate of 0.365, harvesting daily and returning to the original density. Tamaru et al. (1993) using *Nannochloropsis oculata*, achieved a higher population growth rate of 0.588, also harvesting daily but using outside tanks.

The egged female proportion can be a strong quality indicator of the rotifer production. Snell et al. (1987), observed that proportions below 13% of egged female indicates that the rotifer population will decline. In the present study, the only treatment which reached an egged female proportion above of 13% was using 59×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* and with a stocking density of 200 rot mL⁻¹, in the last day of experiment. These results suggest that the concentration of *N. oceanica* used in this treatment was below the necessary for the rotifer maintain their growth and reproduction. In contrast, the treatment, with 200×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* and a rotifer stocking density of 59 rot mL⁻¹, achieved an average egged female proportion of 51.3% with a minimum of 43% during the experimental time, which indicates according to the previous author, an elevated growth during the production period.

The variation of rotifer stocking density and its relationship with the population growth rate was evidenced in this study, in accordance to observed by Yoshinaga et al. (1999). This study demonstrated that population growth rate tends to increase with the increasing of stocking densities, once the rotifers, in high densities start to reproduce earlier. However, the present results demonstrated that the population growth rate is more correlated with the concentration of *N. oceanica* utilized as food, than with the rotifer stocking density.

The rotifer breeding rate is strongly influenced by the species and the concentration of microalgae used as food (Lubzens et al., 2001). In the present study and in Bae and Hur (2011), the microalga concentration unit utilized was established by the number of microalga cells per millions of rotifers per day. In other studies, the microalgae concentration unit used to feed the rotifers are calculated in different forms Lubzens (1987) and Lubzens et al. (1995)

employed the microalga dry weight per millions of rotifers (g d.w. 10^6 rotifers⁻¹), whereas Yuféra and Pascual (1985) employed the number of microalgae cells per volume (cell L⁻¹). Would be advisable the utilization of a pattern to express the amount of microalgae utilized in the rotifer production. The unity utilized in the present study, can be advantageous, since it allows to measure the amount of microalga necessary to feed any density of rotifer without interfere in the water volume of the production. Besides that, it also allows the calculation of cell intake per individual per day.

High values of concentrated microalgae, offered as food for the rotifer, can be harmful for the population and the egged female proportion. High concentrations can interfere in the rotifer locomotion and deteriorate the water quality, leading to a reduced oxygen level and increase the concentration of ammonia and others nitrogen compounds (Lubzens et al., 1995; Yamasaki et al., 1989). In the present study, the unionized ammonia levels increased accordingly to the increase of the rotifer stocking density and *N. oceanica* concentration. The highest level of unionized ammonia found was 0.46 mg NH₃-N L⁻¹ in the treatment with 200×10^9 cells 10^6 rotifers⁻¹ day⁻¹ of *N. oceanica* and a stocking density of 341 rot mL⁻¹. However, concentration until 0.7 mg NH₃-N L⁻¹ are considered safe for rotifer production (De Araujo et al. 2000), not affecting the rotifer production in the present study.

The cost of the production in this study was only related to the *N. oceanica* concentration. Nevertheless, it could express a high cost variation between the created scenarios. The Production Scenario cost was 41% higher than the Maintenance Scenario cost. This result indicates that is possible to greatly reduce costs in periods without rotifer demand.

The statistic factorial model DCCR proved its efficiency for analyses rotifer production. Besides of reduce the number of experimental units and organisms utilized, this model made possible the simulation of different rotifers productions scenarios, which can be used in different periods of production. The Optimized Scenario (OS), was created using the best interactions among results (maximized desirability), in order to optimize the *B. plicatilis* production using *N. oceanica*. The Maintenance Scenario (MS), had as objective the creation of a condition of *B. plicatilis* production with minimum concentration of *N. oceanica* as food, to minimize the production cost and maintain the population density. In contrast, the

Production Scenario (PS), was created to maximize the *B. plicatilis* production growth rate, using high concentrations of *N. oceanica*, which lead to a superior cost.

Through the analysis of this study, it is possible to affirm that the use of *N. oceanica* in a concentration of 300×10^9 cell 10^6 rot⁻¹ day⁻¹ and with a rotifer stocking density of 100 rot mL⁻¹, is the best combination of *N. oceanica* concentration and rotifer *B. plicatilis* density, reaching up to 0.53 population growth rate.

5. References

Asghar, A., Raman, A., Aziz, A., Daud, W.M.A.W., 2014. A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process. Sci. World J. 2014, 86912. <https://doi.org/10.1155/2014/869120>.

Bae, J.H., Hur, S.B., 2011. Selection of suitable species of *Chlorella*, *Nannochloris*, and *Nannochloropsis* in high-and low-temperature seasons for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Fisher. Aquat. Sci. 14(4), 323-332. <https://doi.org/10.5657/FAS.2011.0323>

Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. J. Mar. Res. 11, 87-96.

Box G.E.P., Wilson K.B., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J R Stat Soc, Ser B Stat Meth. 13, 1-45.

Colt, J., Huguenin, J.E., 2002. Design and operating guide for aquaculture seawater systems, Second Edition, Elsevier, Amsterdam.

De Araujo, A.B., Snell, T.W., Hagiwara, A., 2000. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquacult. Res. 31(4), 359-365. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00449.x>

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington.

Ferreira, P.M.P., 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. http://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/publicacoes/pescas.mar/Manual_Cadeia__Alimentar_final.pdf (accessed 20 november 2018)

Guillard, R.R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: Culture of marine invertebrate animals. Springer, Boston, pp. 29-60.

Imamoglu, E., Demirel, Z., Conk Dalay, M., 2015. Process optimization and modeling for the cultivation of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis striata* via response surface methodology. J. Phycol., 51, 442-453. <https://doi.org/10.1111/jpy.12286>.

Lubzens, E., Zmora, O., Barr, Y. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. In: Sanoamuang L., Segers H., Shiel R.J., Gulati R.D. (eds) Rotifera IX. Springer, Dordrecht. 337-353. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0756-6_44

Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A., 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. Aquaculture 133(3-4), 295-309. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00010-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00010-Y)

Lubzens, E., Tandler, A., Minkoff, G., 1989. Rotifers as food in aquaculture. Hydrobiologia 186(1), 387-400. <https://doi.org/10.1007/BF00048937>.

Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia. 147, 245. <https://doi.org/10.1007/BF00025750>

Mateus, N.B., Barbin, D., Conagin, A., 2001. Viabilidade de uso do delineamento composto central. Acta Scient. Technol. 23, 1537-1546. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v23i0.2795>

- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Eghtesadi, R., Nejad, A.S., 2012. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenerg.* 39, 449-453. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.046>.
- Mu, L., Cao, L., Yu, F., Lu, C., Shen, C., Huang, X., Ding, G., 2011. Optimization of culture condition of *Habrotrocha sp.* by using response surface method, in: *Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE)*, 2011 International Conference. 1396-1398. <https://doi.org/10.1109/RSETE.2011.5964542>
- Snell, T.W., Childress, M.J., Boyer, E.M., Hoff, F.H., 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. *J. World Aquacult. Soc.* 18(4), 270-277. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1987.tb01038.x>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *J. Chem. Technol. Biot.* 81(6), 1049–1056. <https://doi.org/10.1002/jctb.1529>
- Tamaru, C. S., Murashige, R., Lee, C. S., Ako, H., Sato, V., 1993. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata* and their effect on the growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture* 110(3-4), 361-372. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90382-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90382-9)
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. *Manual and Guides 12*, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- Verpraet R., Chair M., Leger P., Nelis H., Sorgeloos P., Deleenheer A., 1992. Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia nauplii*. *Aquacultural Engineering* 11, 133-139. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(92\)90015-P](https://doi.org/10.1016/0144-8609(92)90015-P)
- Yamasaki, S., Tanabe, K. and Hiram, H., 1989. Efficiency of chilled and frozen *Nannochloropsis sp.* (marine *Chlorella*) for culture of rotifer. *Mem. Fat. Fish. Kagoshima Univ.*, 38: 77-82.

Yoshinaga, T., Hagiwara, A., Tsukamoto, K., 1999. Effect of conditioned media on the asexual reproduction of the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 412, 103-110. <https://doi.org/10.1023/A:1003860502015>

Yúfera, M. Pascual, E., 1985. Effects of algal food concentration on feeding and ingestion rates of *Brachionus plicatilis* in mass culture. *Hydrobiologia* 122: 181. <https://doi.org/10.1007/BF00032106>

5. CONCLUSÕES

- A produção de rotíferos *Brachionus plicatilis* utilizando a microalga *Nannochloropsis oceanica* como alimento é factível e promissora, uma vez que rotíferos podem atingir uma taxa de crescimento populacional de até 0.53 e proporção de fêmeas ovadas de até 58%.
- A variação na densidade de estocagem de rotíferos *Brachionus plicatilis* interfere na sua produção, no entanto, dentre as variáveis estudadas a concentração de microalga utilizada como alimento é mais relevante.
- A concentração de amônia não ionizada ($\text{mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$) não atingiu nenhum nível prejudicial em nenhum dos tratamentos realizados por esse estudo, no entanto, em períodos mais longos do que o utilizado, pode se tornar um problema para a produção.
- Para uma produção com taxa de crescimento populacional de rotíferos, concentração de amônia não ionizada e custo otimizados, a melhor concentração de *Nannochloropsis oceanica* utilizada como alimento exclusivo é de $270 \times 10^9 \text{ cel } 10^6 \text{ rot}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com uma densidade de estocagem de rotíferos é de 69 rot mL^{-1} .
- Para a manutenção do cultivo de rotíferos, quando não há demanda pelos mesmos, a melhor concentração de *Nannochloropsis oceanica* utilizada como alimento exclusivo é de $140 \times 10^9 \text{ cel } 10^6 \text{ rot}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com uma densidade de estocagem de rotíferos é de 180 rot mL^{-1} .
- Para a produção em massa de rotíferos, a melhor concentração de *Nannochloropsis oceanica* utilizada como alimento exclusivo é de $300 \times 10^9 \text{ cel } 10^6 \text{ rot}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com uma densidade de estocagem de rotíferos é de 100 rot mL^{-1} .