

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**CONTRIBUIÇÃO DOS MICROORGANISMOS
PARA A ALIMENTAÇÃO DO CAMARÃO-
ROSA *Farfantepenaeus paulensis*
(CRUSTACEA: DECAPODA) EM SISTEMAS
DE CULTIVO E NO ESTUÁRIO DA LAGOA
DOS PATOS**

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Oceanografia Biológica da
Fundação Universidade Federal
do Rio Grande, como requisito
parcial à obtenção do título de
Doutor.

**Orientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr.
Co-orientador: Dr. Paulo César Abreu**

Rio Grande

Abril 2008

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese a minha família
que sempre foi meu maior apoio e
estímulo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus orientadores, Wilson Wasielesky e Paulo César Abreu pelo incentivo, apoio e amizade prestados ao longo dos anos de mestrado e doutorado. Também ao professor Ronaldo Cavalli que contribui muito para a realização de todos os meus trabalhos e sempre me incentivou para o crescimento profissional.

Aos membros da banca agradeço não apenas por terem aceitado o convite e pelas contribuições ao trabalho, mas também pelo apoio prestado em minha carreira na FURG. Ao professor Fernando D’Incao, que também é meu chefe no Departamento de Oceanografia, agradeço pela confiança ao me permitir cursar o Doutorado sem comprometer meu serviço como funcionário da Universidade. A professora Clarisse Odebrecht, agradeço pela colaboração nas contagens e identificação dos microorganismos e pelo seu exemplo de dedicação e curiosidade a respeito de tudo que aparece sob a objetiva de um microscópio. Ao professor Ricardo Robaldo agradeço pelo exemplo de dedicação e perseverança no estudo científico.

Agradeço ao professor Norton Gianuca pela confiança e apoio prestados no início de minha carreira na EMA.

Agradeço aos funcionários da EMA, “seu” Hermes e Santa Casa pelo apoio durante os experimentos no Justino e ao Sandro pela ajuda nas análises químicas. Também a “dona” Enilda e a Linamara pela amizade construída nos últimos nove anos de trabalho.

Agradeço aos alunos e colegas de laboratório Maurício, Tati, Liza, Sílvia, Adriana, Paula, Sabrina, Diogo, Kassio, Lise Marie, Leandro, Geraldo, Mineiro, Dariano, Cyntia, Tito, Luciano e tantos outros que ainda estão ou já passaram pela EMA e muito contribuíram para minha formação profissional. Agradeço também ao professor Marcos Santos que me ensinou muito a respeito de larvicultura e cultivo de camarões.

A Diana e ao Charles pelo companheirismo na produção de pós-larvas de camarão.

Agradeço ao Curso de pós-graduação em Oceanografia Biológica por ter me dado à oportunidade de cursar o Doutorado, em especial aos professores César Costa e José Muelbert que coordenaram a Comcur durante o meu curso. Agradeço muito a Vera pelas dicas sempre importantes e pela colaboração durante o Doutorado.

Aos professores do PPGOcBio agradeço pelas excelentes aulas ministradas. Em especial ao prof. Paul Kinas pelo apoio nas análises estatísticas.

Agradeço a FURG, pois nesta universidade cursei graduação, mestrado e doutorado e ainda me abriga como funcionário e, portanto, significa muita na minha vida e de toda a minha família.

Agradeço a minha mãe e a minha vó, principalmente pela paciência nos meus anos de juventude.

A minha mulher e meus filhos pelos momentos mais importantes de minha vida e também pela paciência nos anos de pós-graduação.

Enfim agradeço a todos que colaboraram para minha formação profissional e humana ao longo de minha vida acadêmica, pois sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui.

MUITO OBRIGADO!!!!

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1. O camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i>	5
2. A pesca do camarão-rosa no estuário da Lagoa dos Patos.....	7
3. O cultivo do camarão-rosa como alternativa para geração de renda.....	8
4. A contribuição dos microorganismos em ambientes aquáticos e em sistemas de cultivo.....	10
5. Objetivos e estrutura da Tese.....	15
6. Antecedentes e justificativas.....	17
6.1. A contribuição dos microorganismos na dieta do camarão-rosa <i>F. paulensis</i>	17
6.2. A técnica de isótopos estáveis como ferramenta para determinar a contribuição das fontes alimentares para a biomassa de camarões cultivados e/ou selvagens.....	18
6.2.1. O que são isótopos estáveis.....	19
6.2.2. Aplicando a técnica de isótopos estáveis.....	22
6.3. O cultivo de camarões em sistemas sem renovação de água e com flocos microbianos.....	25
METODOLOGIA GERAL.....	28
1. Locais de realização dos experimentos.....	28
2. Obtenção dos animais experimentais.....	31

3. Contagem de microorganismos.....	37
4. Análise de isótopos estáveis.....	39
CAPÍTULO 1: Berçário do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> em gaiolas com substratos artificiais: análise da composição do biofilme e do desempenho dos camarões.....	41
CAPÍTULO 2: Influência do biofilme no cultivo do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> em cercados no estuário da Lagoa dos Patos...	44
CAPÍTULO 3: Importância do biofilme como fonte de alimento para o camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> avaliada através de isótopos estáveis de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$).....	47
CAPÍTULO 4: Avaliação das fontes alimentares utilizadas pelo camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> através de isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$)	50
CAPÍTULO 5: Efeito de dietas práticas com diferentes níveis de proteína no desempenho de juvenis do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> cultivados durante a fase de berçário em um sistema intensivo, sem renovação de água com flocos microbianos.....	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	63
ANEXO I: Nursery of the pink shrimp <i>Farfantepenaeus paulensis</i> in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance.....	74
ANEXO II: Influência do biofilme no cultivo do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> em cercados no estuário da Lagoa dos Patos...	83

ANEXO III: Importance of biofilm as food source for shrimp (<i>Farfantepenaeus paulensis</i>) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$).....	122
ANEXO IV: Avaliação das fontes alimentares utilizadas pelo camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> através de isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$).....	132
ANEXO V: Effect of practical diets with different protein levels on the performance of <i>Farfantepenaeus paulensis</i> juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system.....	180

RESUMO

O camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* é uma espécie nativa do oceano Atlântico Sul que tem importância econômica e ecológica no estuário da Lagoa dos Patos, RS. Pesquisas recentes demonstraram a viabilidade do cultivo deste camarão em estruturas alternativas de baixo custo e também em sistemas de cultivo convencionais, nesta tese foram investigados aspectos da contribuição dos microorganismos na alimentação do camarão-rosa em sistemas de cultivo e no ambiente natural. Os dois primeiros capítulos abordaram a influência do biofilme, um consórcio de microorganismos formado sobre superfícies submersas, no cultivo de pós-larvas e juvenis de *F. paulensis* no estuário da Lagoa dos Patos, procurando ainda definir a possível seletividade dos camarões por determinados microorganismos presentes no biofilme. No terceiro e quarto capítulos foi utilizada a técnica de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para determinar a contribuição das diversas fontes alimentares disponíveis, para o crescimento de camarões cultivados e selvagens. No quinto capítulo foi abordado o cultivo do *F. paulensis* em sistemas sem renovação de água com flocos microbianos. Os resultados dos capítulos 1 e 2 mostraram que pós-larvas de *F. paulensis* cultivadas em gaiolas apresentaram crescimento e sobrevivência significativamente maiores ($p < 0,05$) quando foi disponibilizada maior quantidade de biofilme para sua ingestão. Além disso, foi observada uma seletividade das pós-larvas pelas diatomáceas cêntricas presentes no biofilme. Para juvenis de *F. paulensis* cultivados em cercados na fase de engorda, foi observada uma predação seletiva sobre

protozoários ciliados, rotíferos e nematódeos presentes no biofilme e, durante os períodos de maior predação sobre o biofilme, os camarões apresentaram taxa de crescimento significativamente maior ($p < 0,05$). A utilização da técnica de isótopos estáveis permitiu estimar a contribuição do biofilme em aproximadamente 49 % do carbono e 70 % do nitrogênio para as pós-larvas cultivadas em gaiolas, enquanto que para juvenis cultivados em tanques a contribuição de nitrogênio do biofilme foi de cerca de 29 %. Para os juvenis capturados e cultivados em cercados no estuário foi demonstrado que o biofilme, sedimento superficial e material em suspensão podem contribuir, juntos, até 50 % da biomassa dos camarões e que, quando cultivado em densidades de estocagem de até 10 camarões/m², a ração comercial pode ser suprimida até que os camarões atinjam aproximadamente 4 gramas, pois o alimento natural proporciona nutrientes suficientes para o crescimento dos camarões nesta fase. No último experimento, realizado durante o cultivo de juvenis de *F. paulensis* em tanques com flocos microbianos e sem renovação de água, foi observado que os níveis de proteína na ração podem ser reduzidos de 45 para 35 % sem comprometer o crescimento desta espécie, pois os flocos microbianos funcionam como fonte suplementar de proteína. De uma maneira geral, os resultados demonstraram a importância dos microorganismos presentes no biofilme, material em suspensão, sedimento superficial e nos flocos microbianos para a alimentação do camarão-rosa *F. paulensis*.

ABSTRACT

The pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* is an endogenous species from Southern Atlantic Ocean that has ecological and economical importance at Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. Recent studies have shown the feasibility of culturing this species either in alternative, low cost structures or in conventional culture systems. In the present thesis, we investigated some aspects of the contribution of the microorganisms on the feeding of the pink shrimp in culture systems and in the natural environment. In chapters 1 and 2 we investigate the influence of the biofilm, a microorganisms consortium which naturally forms attached to submersed surfaces, on *F. paulensis* postlarvae and juveniles reared at the Patos Lagoon estuary. In addition we assessed the selectivity of particular microorganisms from the biofilm by the shrimp. In chapters 3 and 4 we utilized the carbon and nitrogen stable isotopes technique in order to determine the contribution of the different food sources available for the growth of captured and cultured shrimp. In chapter 5, we investigated the culture of *F. paulensis* in a zero-exchange suspended microbial floc culture system. The results of chapters 1 and 2 showed that shrimp postlarvae cultured in cages at the estuary achieved significant higher ($p < 0.05$) survival and growth when a high quantity of biofilm was available for their consumption. For shrimp cultured at net pens during the grow-out phase it was observed a selective predation over ciliate protozoa, rotifers and nematodes present in the biofilm, and, during periods when shrimp presented a higher biofilm consumption shrimp, significantly higher ($p < 0.05$) growth rates were observed. With the

stable isotopes technique it was possible to estimate biofilm contribution of 49 % carbon and 70 % nitrogen to postlarvae reared in cages while, for shrimp juveniles reared in tanks, biofilm contributed up to 29 % of nitrogen. For juveniles cultured in pens and captured at the estuary it was shown that the biofilm, superficial sediment and suspended matter may contribute, together, to up to 50 % of shrimp biomass and, when cultured at stocking densities up to 10 shrimp/m², there is no need to supply artificial feed until shrimp reach about 4 grams, because natural food can sustain shrimp growth during this phase of rearing. In the last experiment, performed during the culture of *F. paulensis* juveniles in tanks with zero water exchange and suspended microbial flocs, it was observed that dietary protein levels may be reduced from 45 to 35 % without affecting shrimp growth because microbial flocs may also work as a source of protein. This showed the importance of microorganisms present in the biofilm, suspended matter, superficial sediment and microbial flocs on the feeding of the pink shrimp *F. paulensis*.

INTRODUÇÃO GERAL

1. O Camarão-Rosa *Farfantepenaeus paulensis*

O camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) é uma espécie nativa do Atlântico Sul que tem sua área de distribuição compreendida desde o litoral nordeste brasileiro (Ilhéus, 14° S) até o litoral nordeste da Argentina (Mar del Plata, 38° S) (D’Incao 1995).

O ciclo de vida desta espécie compreende um estágio adulto em regiões de plataforma, onde ocorrem à reprodução e desova, resultando em ovos demersais dos quais eclodem larvas planctônicas no estágio de náuplio. Estas larvas passam ainda pelos estádios de protozoa e mÍsis antes de atingirem a condição de pós-larva. As pós-larvas, ainda planctônicas, penetram em ambientes costeiros (baías e/ou zonas estuarinas) onde passam a ocupar o ambiente bentônico, quando recebem a denominação de juvenis. Nestes ambientes os camarões permanecem por cerca de três a quatro meses, quando então migram para o oceano e atingem a fase adulta, completando seu ciclo de vida (Fig. 1) (Iwai 1978; D’Incao 1983).

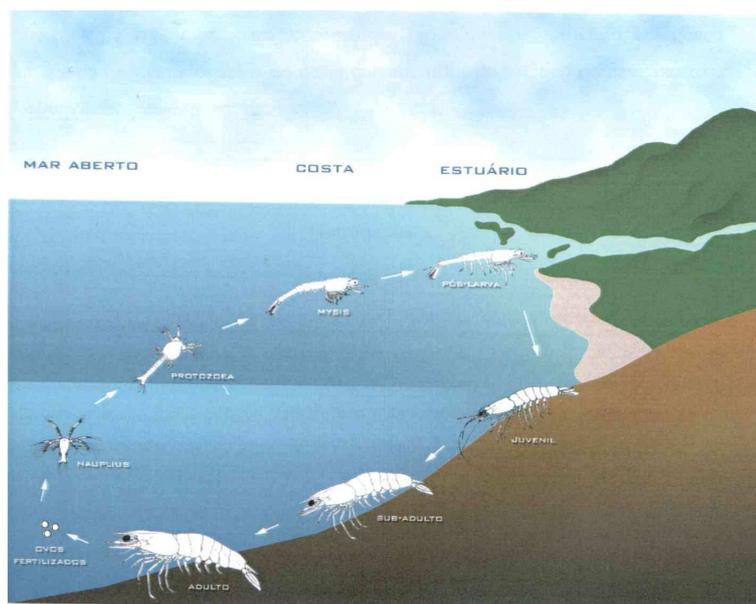


Figura 1. Ciclo de vida do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*.

Após uma reestruturação da sistemática da família Penaeidae, proposta por Pérez Farfante & Kensley (1997) e baseada principalmente na análise das estruturas reprodutivas dos camarões, a atual classificação taxonômica do *F. paulensis* é a seguinte:

Subfilo Crustacea (Pennant 1777)

Classe Malacostraca (Latreille 1806)

Subclasse Eumalacostraca (Grobber 1892)

Superordem Eucarida (Calman 1904)

Ordem Decapoda (Latreille 1903)

Subordem Dendrobranchiata (Bate 1888)

Superfamília Penaeoidea (Rafinesque 1815)

Família Penaeidae (Rafinesque 1815)

Gênero *Farfantepenaeus* (Burukovsky 1997)

Espécie *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante 1967)

2. A pesca do camarão-rosa no estuário da Lagoa dos Patos

O camarão-rosa tem grande importância comercial na pesca industrial e artesanal realizada nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sendo que a pescaria artesanal realizada no estuário da Lagoa dos Patos no estado do Rio Grande do Sul (Fig. 2) é responsável por uma grande parte do volume total capturado, podendo atingir mais de 50% do total capturado anualmente (Valentini *et al.* 1991; D'Incao *et al.* 2002).

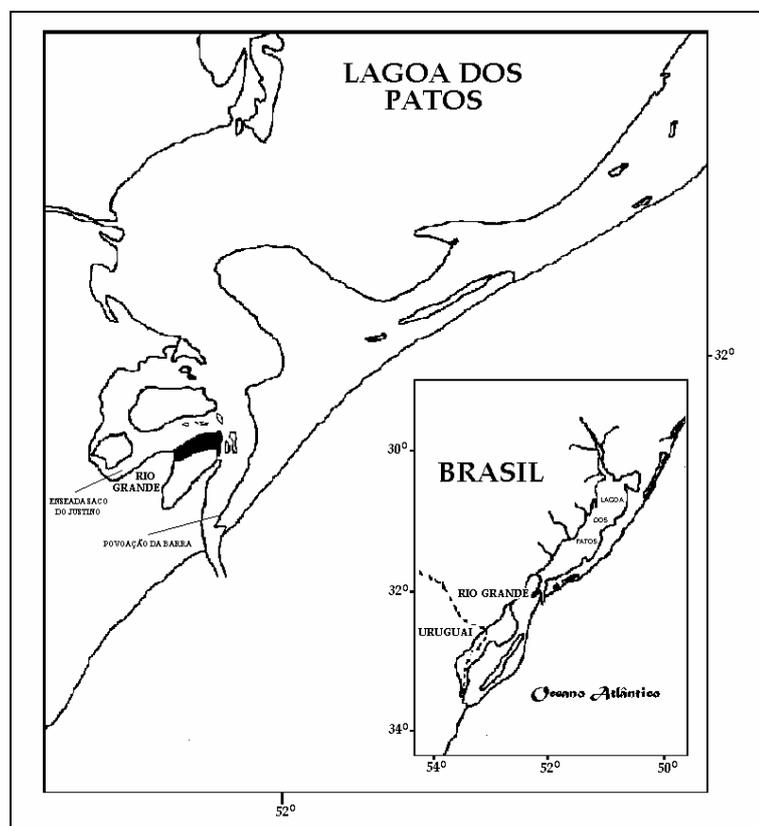


Figura 2. Localização do estuário da Lagoa dos Patos em relação ao estado do Rio Grande do Sul - Brasil.

A Lagoa dos Patos é um sistema lagunar (Kjerfve 1986), sendo que sua porção estuarina possui aproximadamente 1000 km² de águas com pequena

profundidade, alta produtividade primária e secundária e sedimentos arenolodosos ricos em organismos bentônicos (Wasielesky *et al.* 2004).

A estreita comunicação do estuário com o oceano Atlântico condiciona a penetração das pós-larvas de camarão a fatores ambientais como pluviosidade, correntes costeiras e ventos durante as estações de primavera e verão (Castello & Möller 1978). Como a captura de camarão no estuário está diretamente relacionada com o ingresso das pós-larvas, historicamente foi registrada uma grande flutuação da quantidade de camarão capturado anualmente na Lagoa dos Patos (D’Incao 1991), com valores extremos de captura de até 8.000 toneladas em 1972 ou de apenas duas toneladas no ano de 1998 (D’Incao *et al.* 2002). Nas últimas duas décadas também foi registrado um declínio das capturas de peixes teleósteos no estuário e, por causa disto, o camarão-rosa tornou-se uma das únicas espécies economicamente importantes que ainda são exploradas na região (Reis & D’Incao 2000; D’Incao & Reis 2002). Portanto, em anos em que a captura de camarão é pequena, cerca de 6.500 famílias de pescadores artesanais que vivem junto ao estuário tem uma sensível redução na sua renda (Wasielesky *et al.* 2004).

3. O cultivo do camarão-rosa como alternativa para geração de renda

Devido às dificuldades relativas à pesca do camarão-rosa, descritas acima, pesquisadores da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG no início da década de 90 começaram o desenvolvimento de um pacote tecnológico para o cultivo desta espécie. Neste sentido foram realizadas diversas pesquisas cobrindo desde a indução à maturação dos reprodutores

até a engorda dos camarões (Cavalli *et al.* 1997; Cavalli *et al.* 1998; Wasielesky *et al.* 2001). Resultados recentes demonstraram a viabilidade do cultivo do camarão-rosa em viveiros escavados (Peixoto *et al.* 2003) e em cercados instalados diretamente no estuário da Lagoa dos Patos (Fig. 3) (Wasielesky *et al.* 2004), além da possibilidade da produção de juvenis de *F. paulensis* em gaiolas (tanques-rede) para a utilização como isca viva (Preto *et al.* 2005).



Figura 3. Cercado utilizado para o cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* no estuário da Lagoa dos Patos.

Apesar dos bons resultados alcançados, pesquisas continuam sendo feitas com o objetivo de compreender melhor a ecologia do *F. paulensis* e aprimorar as técnicas de cultivo desta espécie (Abreu *et al.* 2006; Jensen *et al.* 2006). Em relação ao cultivo, estudos que contribuam para compreender aspectos nutricionais e de manejo alimentar do camarão são de extrema importância, visto que durante a produção de camarões cerca de 50% dos custos estão relacionados com a alimentação destes organismos (Akiyama *et*

al. 1992; Tacon 1999; Epp 2002). Além disso, apenas 15 a 30% do alimento fornecido é transformado em biomassa pelos organismos cultivados, o resto acaba sendo perdido para o sedimento, efluentes e atmosfera (Horowitz & Horowitz 2002; Barbieri & Ostrensky 2002).

4. A contribuição dos microorganismos em ambientes aquáticos e em sistemas de cultivo

Segundo Sherr & Sherr (2000), os microorganismos podem ser definidos como todos aqueles organismos unicelulares, tanto os procariontes autotróficos e heterotróficos (cianobactérias e bactérias) como os eucariontes autotróficos e heterotróficos (microalgas e protozoários). Entretanto, de uma maneira geral, são considerados também como microorganismos todos aqueles organismos que não podem ser vistos a olho nu e, entre eles, estão alguns pequenos metazoários, como rotíferos, nematódeos e formas larvais de organismos maiores, como os náuplios de crustáceos. Nesta Tese o termo microorganismo é utilizado na sua forma mais abrangente.

De acordo com Horowitz & Horowitz (2002) os microorganismos afetam todos os aspectos da vida em ambientes aquáticos – como fornecedores e consumidores do oxigênio dissolvido, reciclando nutrientes, fornecendo alimento para organismos maiores e como potenciais patógenos. Os microorganismos são pequenos, multiplicam-se rapidamente e são capazes de utilizar praticamente qualquer composto orgânico, o que faz deles o mais versátil e numeroso grupo de organismos presente no ambiente aquático.

Nos sistemas de cultivo os microorganismos também são importantes, além dos aspectos mencionados anteriormente, eles desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade da água, como mediadores do impacto ambiental dos efluentes e no controle de possíveis patógenos (Decamp *et al.* 2002; Moss 2002). Os produtores de organismos aquáticos tem se beneficiado da cadeia alimentar microbiana desde os primórdios deste tipo de atividade. Em sistemas de cultivo extensivos ou semi-intensivos as duas fontes alimentares básicas para os organismos cultivados são a produtividade primária do fitoplâncton e a matéria orgânica adicionada no sistema, via fertilização química, orgânica ou fornecimento de ração artificial, as quais estimulam o crescimento bacteriano e o estabelecimento de toda a cadeia trófica (Moriarty 1997). Segundo Azam *et al.* (2002), a “alça microbiana”, que é um importante elo no fluxo da matéria orgânica em oceanos e estuários, desempenha um papel importante também em ambientes de cultivo. A presença de Nitrogênio e Fósforo na forma dissolvida estimula o crescimento de microalgas e bactérias que os transformam em matéria orgânica particulada, desta forma disponibilizando alimento para os organismos cultivados e ainda contribuindo para a manutenção da qualidade da água do cultivo.

A pesquisa científica moderna tem demonstrado que, mesmo em sistemas intensivos de cultivo de camarão, os microorganismos podem contribuir para a manutenção da qualidade da água (Ebeling *et al.* 2006; Samocha *et al.* 2007) e que a produtividade natural neste tipo de sistema pode sustentar uma porção significativa do crescimento dos camarões cultivados (Anderson *et al.* 1987; Ballester *et al.* 2003; Burford *et al.* 2004; Wasielesky *et*

al. 2006). Além disso, a manipulação da comunidade microbiana pode trazer benefícios tanto ambientais como econômicos. Segundo Avnimelech (2000), a conversão alimentar pode ser sensivelmente melhorada através de um maior aproveitamento do alimento natural presente no ambiente de cultivo, diminuindo assim, a necessidade do fornecimento de alimento exógeno e fazendo com que os custos de produção sejam sensivelmente reduzidos.

Estudos com peixes de água doce (Umesh *et al.* 1999; Azim *et al.* 2001; Mridula *et al.* 2003), microcrustáceos (Langis *et al.* 1988) e camarões (Tidwell *et al.* 2000; Bratvold & Browdy 2001; Thompson *et al.* 2002; Moss & Moss 2004) demonstraram que o biofilme (Fig. 4), que pode ser definido como um consórcio de microorganismos (bactérias, cianobactérias, microalgas, protozoários, pequenos metazoários) associados a uma matriz orgânica que se forma sobre superfícies submersas (Ramesh *et al.* 1999), contribui para a produção de organismos aquáticos, pois é uma rica fonte nutricional, resultando em aumento da sobrevivência e do crescimento dos organismos cultivados. Além disso, os microorganismos presentes no biofilme também contribuem para a manutenção da qualidade da água do cultivo.

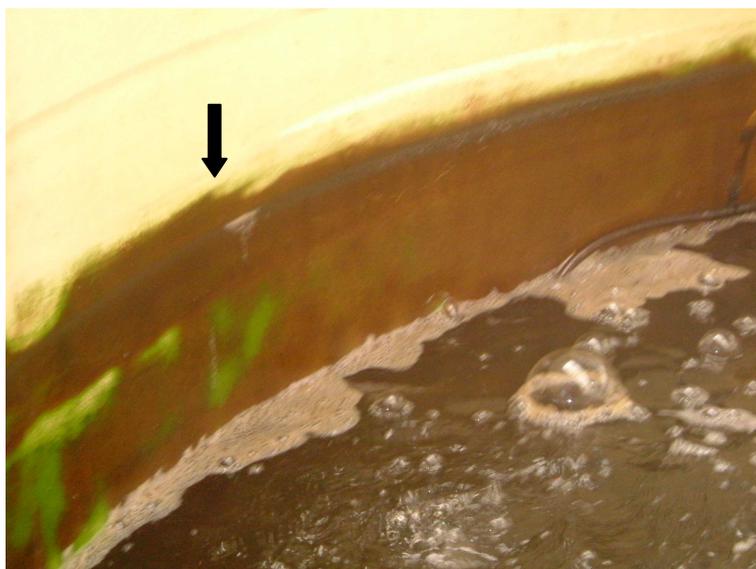


Figura 4. Biofilme formado nas paredes de tanques de concreto utilizados como berçário para camarão.

Além de estudos com biofilme, recentemente foi despertado o interesse pelo cultivo de camarões em sistemas sem renovação de água, onde é estimulada a formação dos chamados flocos microbianos (Burford *et al.* 2004; Wasielesky *et al.* 2006). Os flocos microbianos (Fig. 5) são formados por bactérias, flagelados, ciliados, cianobactérias, microalgas e pequenos metazoários, além de detritos orgânicos (Burford *et al.* 2004). Estes microorganismos têm a capacidade de reciclar a matéria orgânica dentro do próprio ambiente de cultivo, disponibilizando esta para os camarões na forma de proteína microbiana e, desta forma, servindo como uma rica fonte protéica para os organismos cultivados (Decamp *et al.* 2002; Wasielesky *et al.* 2006). Além disso, as bactérias heterotróficas presentes em sistemas com flocos microbianos utilizam o nitrogênio amoniacal originado da excreção dos animais e da decomposição da matéria orgânica para a produção de biomassa

bacteriana, desta forma contribuindo para a manutenção da qualidade da água no ambiente de cultivo (Avnimelech 1999).



Figura 5. Foto micrografia de um floco microbiano.

O principal estímulo para o desenvolvimento de sistemas de cultivo sem renovação de água surgiu da necessidade de produção de camarões em sistemas ambientalmente amigáveis, onde seja bastante reduzida, ou até mesmo eliminada, a emissão de efluentes que possam causar impacto ao ambiente aquático adjacente. Além disso, a reciclagem de nutrientes que ocorre neste tipo de sistema proporciona a redução na utilização de farinha de peixe como fonte principal de proteína para os organismos cultivados (Avnimelech 1999; Boyd 2003). Outro aspecto positivo deste tipo de sistema de cultivo é o maior grau de biosegurança proporcionado devido à independência em relação ao ambiente aquático natural adjacente, evitando assim o risco de introdução e disseminação de patógenos (Wasielesky *et al.* 2006; Emerenciano *et al.* 2007).

5. Objetivos e estrutura da Tese

Os estudos que compõe esta tese abordam aspectos da alimentação do camarão-rosa *F. paulensis* em sistemas de cultivo – gaiolas e cercados, instalados no estuário da Lagoa dos Patos e sistemas sem renovação de água com floco microbiano – e também consideraram aspectos alimentares de camarões capturados no estuário da Lagoa dos Patos. Em todos os estudos foi dada ênfase a contribuição dos microorganismos para a nutrição e o crescimento dos camarões. Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

a) Analisar a contribuição do biofilme no desempenho de pós-larvas de *F. paulensis* cultivadas em gaiolas no estuário da Lagoa dos Patos, verificando se existe seletividade dos camarões por determinados itens do biofilme e se a predação do camarão sobre o biofilme influencia sua composição em termos de microorganismos (Capítulo 1 – Anexo I);

b) Analisar a contribuição do biofilme para o desempenho de juvenis do camarão-rosa *F. paulensis* cultivados em cercados instalados no estuário da Lagoa dos Patos, determinando a composição de microorganismos do biofilme e a possível seletividade dos juvenis de camarão por determinados organismos que compõe o biofilme (Capítulo 2 – Anexo II);

c) Estimar, através da técnica de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, a contribuição do biofilme e da ração artificial para o crescimento de pós-larvas de camarão-rosa *F. paulensis* cultivados em gaiolas no estuário da Lagoa dos Patos e juvenis do camarão-rosa cultivados em tanques em laboratório (Capítulo 3 – Anexo III);

d) Determinar os níveis de fracionamento isotópico de carbono e nitrogênio para *F. paulensis* alimentado apenas com ração artificial em laboratório, estimando-se, também, a contribuição das diferentes fontes de alimento disponíveis para juvenis desta espécie cultivados em cercados no estuário da Lagoa dos Patos e para juvenis de diferentes classes de tamanho capturados na mesma região (Capítulo 4 – Anexo IV);

e) Determinar a possibilidade da redução dos níveis de proteína bruta na ração artificial utilizada durante o cultivo de juvenis do camarão-rosa *F. paulensis* em um sistema sem renovação de água com floco microbiano, avaliando-se a contribuição dos microorganismos como fonte alimentar complementar e sua qualidade nutricional (Capítulo 5 – Anexo V);

Os antecedentes e justificativas relativos aos estudos propostos são descritos no próximo item. O resumo dos resultados de cada um destes estudos é descrito nos capítulos de 1 a 5 e suas versões completas (artigos na forma original de publicação ou de submissão) encontram-se no anexos de I a V.

A metodologia geral utilizada para a produção de pós-larvas e juvenis utilizados nos estudos, contagem de microorganismos, análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio e a descrição dos locais e estruturas onde foram realizados os experimentos estão descritos no item Metodologia Geral.

6. Antecedentes e justificativas

6.1 A contribuição dos microorganismos na dieta do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*

Estudos a respeito da dieta de *F. paulensis* demonstraram que estes camarões consomem microalgas, macroalgas, vegetais superiores, moluscos, poliquetas, pequenos crustáceos, além de matéria orgânica, detritos e sedimento (Jorgensen 1998; Silva & D’Incao 2000; Soares *et al.* 2005). Segundo Soares *et al.* (no prelo), o consumo de macroalgas e macrófitas não é capaz de promover o crescimento e sobrevivência de juvenis de *F. paulensis*. Estes autores sugerem que o consumo destes alimentos deve estar relacionado à ingestão do biofilme aderido aos vegetais, os quais proporcionariam um ganho nutricional aos camarões. Da mesma forma, Silva & D’Incao (2000) associaram o consumo de areia por camarões capturados no estuário da Lagoa dos Patos com o aproveitamento do filme biológico aderido a este sedimento.

Thompson *et al.* (1999) demonstraram a contribuição de bactérias, flagelados e ciliados para a nutrição de larvas de *F. paulensis*. Durante o cultivo do camarão-rosa na fase de berçário foi demonstrado que o biofilme formado nas paredes dos tanques tem a capacidade de reduzir a concentração de nitrogênio amoniacal e a exportação de fósforo para o meio ambiente, o que, potencialmente, diminui o risco de eutrofização dos corpos de água naturais que recebem efluentes dos sistemas de cultivo (Thompson *et al.* 2002). Adicionalmente, estes autores relacionaram o maior crescimento das pós-

larvas cultivadas com a contribuição nutricional obtida pelo consumo de biofilme. Também já foi demonstrada a contribuição do biofilme no cultivo de pós-larvas de *F. paulensis* em gaiolas fixas instaladas em uma enseada estuarina da Lagoa dos Patos quando foram obtidos camarões com peso significativamente maior (11%) em gaiolas onde havia maior quantidade de biofilme disponível (Ballester *et al.* 2003).

Apesar da importância destas informações, os estudos que relacionam a contribuição dos microorganismos na alimentação do camarão-rosa *F. paulensis* estão restritos às fases iniciais de vida desta espécie (larvas e pós-larvas) em condições de cativeiro, faltando informações para que seja avaliada a contribuição do biofilme nas fases mais adiantadas do cultivo quando os camarões atingem maior porte bem como para os camarões que naturalmente habitam o estuário. Além disso, existem ainda lacunas a serem preenchidas quanto à possível seletividade do camarão-rosa por determinados microorganismos presentes no biofilme e quanto à quantificação da real contribuição do biofilme e das outras fontes alimentares disponíveis para o crescimento dos camarões selvagens e cultivados, durante as diferentes fases do seu crescimento ontogênico.

6.2 A técnica de isótopos estáveis como ferramenta para determinar a contribuição das fontes alimentares para a biomassa de camarões cultivados e/ou selvagens

A maioria das informações disponíveis sobre a dieta do camarão-rosa *F. paulensis* é derivada de estudos em que foi feita a análise de seu conteúdo

estomacal (Silva & D’Incao 2000; Santos 2003; Soares *et al.* 2005). Apesar da importância destes estudos, a análise do conteúdo estomacal apresenta algumas limitações, pois não permite a identificação de alguns organismos que são mais rapidamente digeridos ou sofrem trituração durante a passagem pelo trato digestivo (Coman *et al.* 2006). Além disso, a presença de certos itens no trato pode ser devido a sua natureza refratária, por isso existe a dificuldade de determinar a real contribuição dos mesmos para a nutrição dos camarões (Stoner & Zimmerman 1988; Soares *et al.* 2005).

Para determinar a real contribuição dos diversos itens alimentares disponíveis tanto em ambientes de cultivo quanto no meio selvagem, a utilização da técnica de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) é uma ferramenta eficiente para caracterização da dieta alimentar, como já foi verificado em estudos com outras espécies de crustáceos (Nunes *et al.* 1997; Yokoyama *et al.* 2005; Coman *et al.* 2006; Shimoda *et al.* 2007).

6.2.1 – O que são isótopos estáveis

O Isótopo é um átomo de um mesmo elemento químico com diferente número de nêutrons no seu núcleo, o que altera a massa atômica do elemento (Fry 2006). Existem isótopos estáveis e isótopos radioativos, estes últimos têm excesso de energia em seu núcleo e a emitem na forma de partículas (radiação α e β) ou de ondas eletromagnéticas (radiação γ). Os isótopos estáveis não emitem energia e por isso não oferecem risco à saúde humana (Fry 2006). A metodologia utilizada nesta tese está baseada na utilização dos isótopos

estáveis de carbono e nitrogênio. Na figura 6 temos uma ilustração dos isótopos estáveis do elemento carbono:

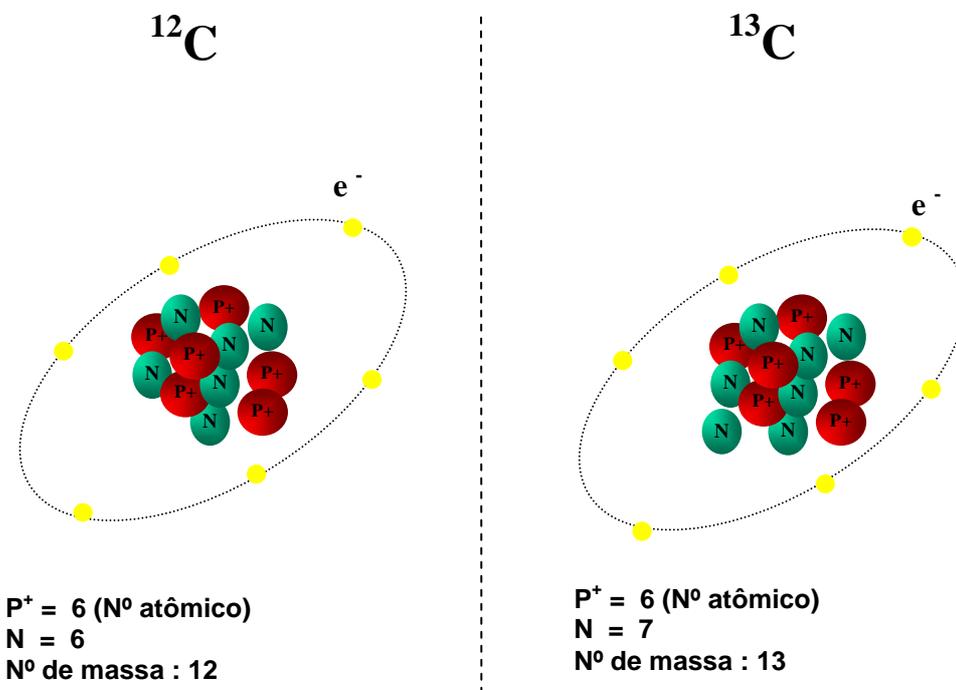


Figura 6. Ilustração esquemática dos isótopos estáveis de carbono.

Carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre são elementos químicos que apresentam isótopos estáveis de interesse biológico que ocorrem naturalmente. Estes elementos químicos apresentam um isótopo estável leve e um ou dois isótopos estáveis pesados. Os termos leve e pesado referem-se ao número de massa de cada um dos isótopos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Abundância natural dos isótopos estáveis em percentual (%) de átomos e suas moléculas gasosas comumente utilizadas em espectrometria de massas

Elemento	% átomos isótopo leve		% átomos isótopo pesado		gás
Hidrogênio	¹ H	99,985	² H	0,015	H ₂
Carbono	¹² C	98,890	¹³ C	1,110	CO ₂
Nitrogênio	¹⁴ N	99,630	¹⁵ N	0,370	N ₂
Oxigênio	¹⁶ O	99,759	¹⁷ O	0,037	CO ₂
			¹⁸ O	0,204	
Enxofre	³² S	95,000	³³ S	0,760	SO ₂
			³⁴ S	4,220	

Fonte: Dr. Dom Phillips EPA – USA (comunicação pessoal)

A notação de um isótopo de um elemento particular recebe a denominação δ^aX , onde ^a representa o número de massa do elemento X.

Esta notação significa a diferença entre a notação do elemento analisado em relação a um elemento padrão. Para os isótopos estáveis de carbono, o padrão internacional é o PeeDee Belemnita originado de carbonato sólido, da era Cretácea, da formação geológica Peedee da Carolina do Sul (USA). Para os isótopos estáveis de nitrogênio, o padrão utilizado é o nitrogênio atmosférico (Fry 2006).

A notação isotópica δ é calculada pela seguinte equação:

$$\delta^aX = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}})/R_{\text{padrão}}] * 1000$$

Onde X representa um elemento particular (C, N, H, O ou S) e R é a razão do isótopo pesado em relação ao isótopo leve para o elemento. Por exemplo, considerando o carbono, qualquer amostra de material orgânico terá uma relação R de C¹³/C¹², ou seja, R_{amostra} é a razão entre o número de átomos que contem o isótopo pesado C¹³ dividida pelo número de átomos que contem o isótopo leve C¹² da amostra, a razão R deste elemento é utilizada juntamente

com a razão R do elemento padrão, que serve como referência para todas as amostras analisadas. A multiplicação por 1000 é realizada, pois os valores normalmente são muito pequenos, desta forma os valores são expressos em δ por mil ou δ ‰ (Fry 2006).

6.2.2 Aplicando a técnica de isótopos estáveis

Partindo do princípio de que cada fonte de alimento possui uma determinada quantidade dos diferentes isótopos de um mesmo elemento, o que lhe caracteriza uma assinatura isotópica, é possível através de equações e modelos matemático-estatísticos, estimar a contribuição de cada fonte alimentar em uma “mistura” que, no caso, será o organismo consumidor em questão (Fry 2006). A técnica de isótopos estáveis utilizada na presente Tese está baseada no fato de que um determinado organismo adquire, ao longo do tempo, o sinal isotópico derivado das fontes alimentares das quais se utiliza. Portanto, conhecendo a assinatura isotópica dos tecidos de um animal e a assinatura isotópica das fontes alimentares por ele consumidas é possível estimar, através de equações ou modelos matemático-estatísticos, a contribuição efetiva de cada uma destas fontes alimentares para a biomassa do organismo consumidor (Phillips 2001; Phillips & Gregg 2001).

Utilizando as assinaturas isotópicas de carbono ou nitrogênio é possível resolver um sistema de equações para até duas diferentes fontes de alimento e um organismo consumidor, quando teremos um sistema com duas equações e duas incógnitas como, por exemplo, usando o carbono como rastreador isotópico:

$$\delta C_{\text{org.}} = f_x \cdot \delta C_x + f_y \cdot \delta C_y$$

$$1 = f_x + f_y$$

Onde $\delta C_{\text{org.}}$, δC_x e δC_y são respectivamente os sinais isotópicos do organismo consumidor, da fonte x e da fonte y, e f_x e f_y são a proporção de cada fonte na assinatura isotópica do consumidor. O mesmo raciocínio pode ser feito para calcular a contribuição de nitrogênio de cada uma das fontes que o organismo consumidor utiliza como alimento.

Desta maneira é possível também calcular a contribuição de até três diferentes fontes de alimento usando as assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio das fontes alimentares e do organismo consumidor, simultaneamente, quando termos um sistema de três equações e três incógnitas, como por exemplo:

$$\delta C_{\text{org.}} = f_x \cdot \delta C_x + f_y \cdot \delta C_y + f_z \cdot \delta C_z$$

$$\delta N_{\text{org.}} = f_x \cdot \delta N_x + f_y \cdot \delta N_y + f_z \cdot \delta N_z$$

$$1 = f_x + f_y + f_z$$

Quando, no entanto, o organismo consumidor tiver mais fontes alimentares disponíveis do que rastreadores isotópicos não é possível precisar a contribuição de cada uma das fontes, mas é possível, através de modelos matemático-estatísticos, estimar as possíveis contribuições de cada fonte alimentar que resultam na assinatura isotópica do organismo. Phillips & Gregg (2003) desenvolveram um software chamado IsoSource, o qual possibilita estimar o intervalo de contribuição de diversas fontes alimentares para os organismos consumidores, disponível na página da internet: <http://www.epa.gov/wed/pages/models.htm>.

Também é preciso considerar que, quando um organismo ingere um determinado alimento, ao incorporar os isótopos deste alimento, ocorre o fracionamento isotópico. Segundo Fry (2006), o fracionamento que os isótopos de um determinado elemento sofrem conforme passam pela cadeia trófica é ocasionado devido ao acúmulo de átomos do isótopo mais pesado nos organismos consumidores, por isso é também chamado de enriquecimento trófico. Isto ocorre, pois os átomos dos isótopos mais leves são mais facilmente quebrados e acabam sendo predominantes na excreção dos organismos (no caso do nitrogênio, o ^{14}N , eliminado na forma de amônia pelos organismos aquáticos) e na respiração (no caso do carbono, o ^{12}C , eliminado na forma de CO_2).

Os estudos sobre cadeias alimentares estão baseados em um enriquecimento isotópico padrão entre o organismo consumidor e sua dieta (Yokoyama *et al.* 2005). Segundo Peterson & Fry (1987), o intervalo aceito para o fracionamento isotópico é de 0 a 1 ‰ para o carbono e 3 a 4‰ para o nitrogênio. Entretanto, em trabalhos recentes, McCutchan *et al.* (2003) e Yokoyama *et al.* (2005) revisaram os valores citados em estudos com isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para organismos encontrados em ambientes costeiros e estuarinos e encontraram valores de fracionamento bem maiores dos que os sugeridos por Peterson & Fry (1987) indicando que o intervalo de fracionamento é muito elevado para ser estabelecido o uso de um valor médio ou padrão e sugerindo que o fracionamento isotópico apresentado por determinado organismo deve ser estimado, sob condições controladas, para só então ser aplicado em estudos sobre a dieta deste organismo.

O detalhamento da metodologia para a análise em espectrômetro de massa das assinaturas isotópicas das fontes alimentares e dos camarões cultivados ou coletados durante este trabalho está descrito no item Metodologia Geral.

6.3 O cultivo de camarões em sistemas sem renovação de água e com flocos microbianos

De acordo com o relatório da FAO (2003), o camarão é a mais importante commodity no mercado de produtos pesqueiros, atingindo cerca de 20% do valor total comercializado mundialmente. Atualmente, o cultivo de camarões marinhos vem crescendo em uma taxa de aproximadamente 15% ao ano (FAO 2007). Entre os incentivos para este crescimento estão à estabilização na produção por captura e o alto valor atingido por este produto no mercado internacional. Entretanto, junto com a rápida expansão da carcinicultura, cresceu a apreensão em relação aos possíveis impactos ambientais causados por esta atividade. Entre os principais motivos de crítica que incidem sobre o cultivo de camarões está o uso indiscriminado de farinha de peixe para produção de rações para a aqüicultura e a geração de efluentes ricos em nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) que podem acelerar o processo de eutrofização dos corpos de água naturais que os recebem (Naylor *et al.* 2000; Boyd 2003).

Dentro deste contexto surgiu o interesse pelo cultivo de camarões em sistemas ambientalmente amigáveis, que reduzam ou eliminem os possíveis impactos ambientais da atividade. O desenvolvimento deste tipo de sistemas

foi iniciado na década de 90 nos Estados Unidos, quando Hopkins *et al.* (1995) demonstraram a possibilidade de produzir mais de cinco toneladas do camarão branco *Litopenaeus vannamei* por hectare em viveiros onde não havia renovação de água. Em estudos mais recentes foram reportadas produções de até treze toneladas/ha de *L. vannamei* cultivados sem troca de água em tanques revestidos com geomembrana (McIntosh 2000) e produções em tanques alocados em estufas equivalentes a até trinta e cinco toneladas/ha (McBee *et al.* 2003).

Neste tipo de sistema não são gerados efluentes, existe maior biosegurança, e a produtividade primária derivada dos flocos microbianos formados durante o ciclo de produção pode contribuir para a redução dos níveis de proteína da ração utilizada durante o cultivo (Decamp *et al.* 2002; Wasielesky *et al.* 2006). Além disso, os microorganismos que compõem o floco também são capazes de utilizar os compostos nitrogenados originados da excreção dos camarões e da decomposição dos restos de alimento para seu crescimento, desta forma mantendo a qualidade da água em níveis adequados para o cultivo de camarão (Avnimelech 1999; Ebeling *et al.* 2006).

O camarão-rosa *F. paulensis* já demonstrou potencial para o cultivo em sistemas convencionais no sul do Brasil (Peixoto *et al.* 2003). Entretanto, em relação ao seu cultivo em sistemas sem renovação de água com floco microbiano poucos estudos foram realizados e estão restritos à fase de pós-larva ou pré-berçário (Emerenciano 2007; Emerenciano *et al.* 2007). O *F. paulensis* é uma espécie que possui alta necessidade de proteína na ração (Froes *et al.* 2006), portanto, a possibilidade de redução no teor protéico do

alimento oferecido, quando o cultivo é realizado em meio ao floco microbiano, é bastante atrativa tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

METODOLOGIA GERAL

1. Locais de realização dos experimentos

Os experimentos conduzidos em laboratório foram realizados nas instalações da Estação Marinha de Aquacultura da FURG (Fig. 7) que está localizada na praia do Cassino, município de Rio Grande – RS.



Figura 7. Vista Frontal da Estação Marinha de Aquacultura da FURG.

Os experimentos realizados em gaiolas (Fig. 8) e cercados (Fig. 9) foram conduzidos no estuário da Lagoa dos Patos na enseada Saco do Justino (Fig. 10) onde existe uma base de apoio do Projeto Camarão, localizada no Laboratório de Aquacultura Continental da FURG (Fig. 11)



Figura 8. Gaiolas utilizadas para experimentos instaladas na enseada Saco do Justino - estuário da Lagoa dos Patos.



Figura 9. Cercados utilizados para experimentos instalados na enseada Saco do Justino - estuário da Lagoa dos Patos.



Figura 10. Vista aérea da enseada Saco do Justino – estuário da Lagoa dos Patos.



Figura 11. Base avançada da EMA – FURG na enseada Saco do Justino – estuário da Lagoa dos Patos.

A enseada Saco do Justino possui uma área de 260 ha, apresenta baixa profundidade (0,7 à 1,5 m) e fundo areno-lodoso (Bemvenuti 1987), o que a torna ideal para o cultivo nestes tipos de estruturas. As gaiolas e cercados utilizados para os experimentos foram confeccionados com malha de poliéster

revestido por PVC (Sansuy®) e foram montados com estruturas de bambu e arame galvanizado.

2. Obtenção dos animais experimentais

Todos os camarões utilizados nos experimentos foram produzidos na Estação Marinha de Aquacultura – EMA – FURG, no setor de larvicultura de camarões. Os náuplios utilizados para a larvicultura são provenientes do setor de maturação da própria EMA e são obtidos a partir de reprodutores capturados em mar aberto, no litoral do estado de Santa Catarina.

Após a captura os reprodutores são transportados via terrestre para o laboratório e são colocados em tanques circulares de concreto (10 m², 5.000 L) (Fig. 12).



Figura 12. Reprodutores de *F. paulensis* em tanques de aclimação da Estação Marinha de Aquacultura

Depois de um período de aclimatação que pode variar de 5 a 10 dias é iniciado o processo de indução à maturação através de controle hormonal (ablação unilateral do pedúnculo ocular), ambiental (fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro, temperatura da água entre 26 e 29 °C e salinidade de 30 a 34) e nutricional (alimentação variada com ração específica para maturação INVE – Breed S[®], camarão, siri, lula mexilhão e peixe). O monitoramento do desenvolvimento gonadal é realizado diariamente por volta da 17 horas, quando as fêmeas prestes a desovar são então transferidas para tanques circulares individuais (150 L) no setor de desova da EMA (Fig. 13), onde permanecem até a manhã seguinte, quando são retiradas amostras para checagem da desova e do percentual de fertilização dos ovos.



Figura 13. Sala de desova para camarão da EMA.

Os ovos viáveis são desinfetados com solução de formalina (100 ppm, por 30 segundos) e iodo (20 ppm, por 30 segundos) e transferidos para incubadoras cilindro cônicas (500 L) onde permanecem por um período de

aproximadamente 24 horas até a eclosão. O detalhamento da metodologia empregada para a maturação e desova de *F. paulensis* na EMA pode ser encontrada nos trabalhos de Cavalli *et al.* (1997) e Peixoto *et al.* (2005).

Após cerca de 18 horas de incubação ocorre a eclosão dos náuplios, que são concentrados com o auxílio de uma fonte luminosa, coletados em um balde coletor com malha de 200 micrômetros, transferidos para baldes com volume conhecido, contados e então transferidos para os tanques da sala de larvicultura da EMA (Fig. 14).



Figura 14. Vista parcial da sala de larvicultura de camarões da EMA

A sala de larvicultura de camarão marinho da EMA conta com nove tanques de fibra em formato de “U” com um volume útil de 11 toneladas. O sistema de aeração dos tanques é feito de canos de PVC de 25 mm e está acoplado a dois sopradores tipo “blower” de 3 e 5,5 CV, que dispõe de um sistema de emergência para casos de falta de energia elétrica, o qual é suprido por um gerador a diesel.

Toda a água utilizada no setor de larvicultura é filtrada em filtro de cartucho com abertura de 5 micras, clorada (15 ppm) e declorada com vitamina C (1ppm). Para evitar problemas com metais pesados é adicionada uma dose inicial de 40 ppm de EDTA 12 horas antes da estocagem dos náuplios e diariamente é adicionada uma dose de 10 ppm de EDTA para a água que é adicionada ao tanque.

A temperatura empregada durante a larvicultura de *F. paulensis* é de $29\pm 1^{\circ}\text{C}$. A manutenção da temperatura é realizada através de aquecedores de aço 916 com potência de 3,5 KW. O sistema de aquecimento conta ainda com um trocador de calor.

A densidade de estocagem inicial empregada nos tanques de larvicultura é em torno de 300-500 náuplios/litro. No início da larvicultura o volume utilizado é de cerca de seis toneladas, ao longo do cultivo o volume é aumentado (durante a fase de protozoa) e a densidade final de cultivo é em torno de 100-150 pós-larvas/litro.

Durante a larvicultura o camarão passa por três fases larvais:

- náuplio – seis estádios (alimentação vitelínica);
- protozoa – três estádios (início da alimentação exógena);
- misis – três estádios.

Após o estágio de misis III, a larva sofre a última metamorfose atingindo a fase de pós-larva (Fig. 15).

A alimentação das larvas é realizada através da utilização de fitoplâncton. A partir do estágio de protozoa I, são utilizadas em nosso laboratório as espécies de diatomáceas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira*

weissflogii para alimentação das larvas de camarão e que também auxiliam na manutenção da qualidade da água.

A partir do estágio de protozoa II são utilizadas rações comerciais (INVE[®]) produzidas especificamente para cada estágio de desenvolvimento larval do camarão. As quantidades de ração utilizadas foram adaptadas de protocolos existentes para a produção do camarão exótico *L. vannamei*. A partir do estágio de mÍsis I é fornecido zooplâncton (náuplios de *Artemia sp.* congelados) e quando os camarões atingem o estágio de pós-larva os náuplios de *Artemia sp.* são fornecidos vivos até o estágio de PL 20 (pós-larva após vinte dias de metamorfose).



Figura 15. Pós-larvas de *F. paulensis* produzidas no setor de Larvicultura do Laboratório de Maricultura da FURG

Quando as larvas atingem o estágio de mÍsis I é iniciada a renovação de água. A taxa de renovação diária utilizada varia de 30 até 50% por dia,

entretanto em casos de problema com a qualidade da água a renovação pode atingir até 100% ao dia.

Para o controle de bactérias nocivas ao cultivo durante a larvicultura o uso de antibióticos foi substituído pelo uso de probiótico composto por três espécies de bactérias do gênero *Bacillus* (MIC, INVE[®]) e os náuplios de *Artemia sp.* utilizados para alimentação da larvas e pós-larvas são eclodidos na presença de um bacteriostático (Hatch Control, INVE[®]).

Durante todo o período de larvicultura, amostras de larvas são retiradas três vezes ao dia para observação ao microscópio, quando são observados os estágios de desenvolvimento larval, preenchimento do trato digestivo, presença de necroses, desenvolvimento branquial e presença de epibiontes. Também são recolhidas amostras em béqueres de vidro para observação do estado geral das larvas/pós-larvas, movimentação, presença de larvas mortas, quantidade de ração e fezes. A partir destas observações são tomadas medidas relativas às doses de probiótico utilizadas, grau de renovação de água e necessidade de utilização de outras medidas terapêuticas, como adição de formalina ou fungicida.

A metodologia de larvicultura atualmente utilizada na EMA tem possibilitado a produção de pós-larvas de camarão com sucesso. A sobrevivência média, desde o estágio de náuplio até PL 20 é de aproximadamente 40%, considerada satisfatória mesmo quando comparada a laboratórios comerciais de produção. Toda a metodologia utilizada para a larvicultura do camarão-rosa *F. paulensis* esta baseada nos trabalhos de Marchiori (1996) e Ballester *et al.* (2007).

As pós-larvas utilizadas para os experimentos da Tese foram mantidas nos tanques de larvicultura até aproximadamente estágio de PL 25. Posteriormente, estas pós-larvas foram transferidas para tanques berçário (Fig. 16), onde foram alimentadas com ração comercial específica para esta fase e permaneceram até que os camarões atingissem tamanho para serem utilizados nos experimentos de engorda.



Figura 16. Vista aérea dos tanques berçário externos da EMA.

Para os experimentos realizados no estuário da Lagoa dos Patos os camarões foram previamente aclimatados à salinidade (5 partes por dia até atingir salinidade 15 e 3 partes por dia até atingir salinidade 5) e temperatura da água (até 2°C por dia).

3. Contagem de microorganismos

As contagens de microorganismos foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos da FURG.

As amostras de biofilme e floco microbiano foram fixadas em solução de formol 4%. Para remover o biofilme dos substratos foi utilizado um aparelho de ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, ColeParmer Instrument Co.) na amplitude de 20Khz de 6 a 8 vezes em intervalos de 15 a 20 segundos seguidos por 15 a 20 segundos de descanso para evitar aquecimento da amostra (Thompson *et al.* 2002).

Para contagem de bactérias e flagelados, subamostras de 1ml foram filtradas em membrana de polycarbonato (Nuclepore – 0,2µm de poro, diâmetro 25mm) previamente escurecidos com Irgalan black e corados com o fluorocromo laranja de acridina na concentração final de 10 µg/mL (Hobbie *et al.* 1977). As contagens foram realizadas em um microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan, equipado com conjunto de filtros de luz 487 703 (BP365/11; FT 395; LP 397), com magnificação final de 1000x. Foram realizadas contagens em 30 campos por lâmina escolhidos aleatoriamente.

Para caracterização e contagem de microorganismos maiores como diatomáceas, ciliados, cianobactérias filamentosas, rotíferos, copépodos e nematódeos, subamostras de 0,1ml a 2,1ml foram levadas à câmara de sedimentação. Foram contados no mínimo 30 campos por câmara, escolhidos aleatoriamente, utilizando microscópio invertido Zeiss Axiovert equipado com contraste de fase (Utermöhl 1958). A magnificação final utilizada foi de 200 a 400x

4. Análises de isótopos estáveis

As análises de isótopos estáveis para os experimentos do Capítulo 3 desta Tese foram realizadas no Departamento de Ecologia da Universidade de Lund – Suécia. As análises de isótopos estáveis para os experimentos do Capítulo 4 desta Tese foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu – SP, Brasil.

Todos os materiais analisados foram secos a 60 °C até atingir peso constante, congelados e enviados para os laboratórios citados acima para realização da análise de isótopos estáveis. Nestes laboratórios as amostras eram pulverizadas e colocadas em cápsulas de estanho para posterior combustão em espectrômetro de massa.

No laboratório da Universidade de Lund, a combustão foi realizada em um módulo PDZ Europa ANCA-GSL e as medidas de concentração dos isótopos foram realizadas com um analisador de isótopos estáveis PDZ Europa 20-20.

No Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP foi utilizado o espectrômetro de massa de razão isotópica DELTA-S (Finningan Mat, Alemanha) acoplado ao Analisador Elementar EA 1108 CHN (Itália).

Em ambos os laboratórios, a notação isotópica foi determinada através da diferença relativa da fração isotópica entre as amostras e padrões conhecidos como demonstrado na equação:

$$\delta X = ((R_{amostra} / R_{padrão}) - 1) \times 1000$$

Onde X representa a amostra de ^{13}C ou ^{15}N e a razão correspondente é $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $R = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Todas as razões isotópicas são dadas em partes por

mil (‰). Os padrões utilizados são: Pee dee belemnita para o ^{13}C e nitrogênio atmosférico para o ^{15}N .

Na figura 17 está representada esquematicamente o sistema de combustão e análise realizadas em espectrômetro de massa e analisador elementar.

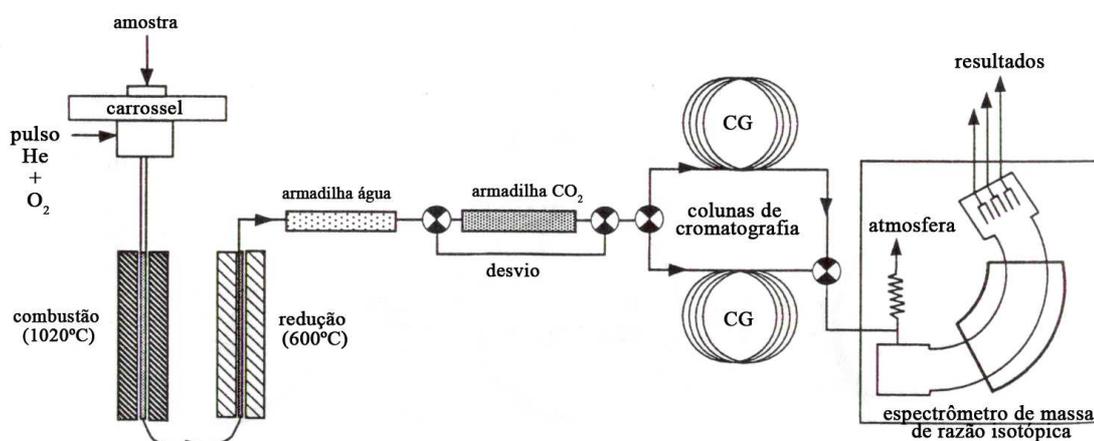


Figura 17. Ilustração esquemática de espectrômetro de massa acoplado a analisador elementar.

CAPÍTULO 1

**BERÇÁRIO DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* EM
GAIOLAS COM SUBSTRATOS ARTIFICIAIS: ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO
DO BIOFILME E DO DESEMPENHO DOS CAMARÕES^{1,2}**

¹ Artigo publicado na revista Aquaculture.

² A forma integral deste estudo encontra-se no Anexo I desta Tese.

Resumo

O uso de substratos artificiais para crescimento de biofilme foi investigado durante o cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em gaiolas instaladas em uma área estuarina rasa da Lagoa dos Patos, extremo sul do Brasil. Foram instaladas nove gaiolas (2 m²; 1,4 m de altura) feitas de poliéster revestido de PVC (abertura de malha 1,5 mm), suportadas por estrutura de bambu. Para permitir o desenvolvimento do biofilme, as gaiolas foram instaladas na água 15 dias antes de serem estocadas com camarão. Em seis das gaiolas, aleatoriamente escolhidas, foram colocadas duas telas de polietileno, com abertura de malha de 1mm, aumentando a área para fixação de biofilme em aproximadamente 8 m² (aumento de cerca de 100 % da área lateral). Em três gaiolas com substratos e em três gaiolas sem substratos foram estocadas pós-larvas do camarão-rosa na densidade de estocagem de 300 PLs/m². As três gaiolas com substratos onde não foram estocados camarões serviam de controle para o efeito da predção sobre o biofilme. Os camarões foram alimentados com ração artificial de alta qualidade (Zeigler[®], 40 % PB). Durante o período experimental foram monitorados o pH, temperatura, salinidade e as concentrações de amônia da água, nas gaiolas e em um ponto controle distante 60 metros do local de cultivo. Em relação ao biofilme formado nos substratos artificiais foram monitoradas as concentrações de clorofila *a* e retiradas amostras para posterior contagem dos microorganismos presentes no biofilme. Após trinta dias os camarões cultivados em gaiolas com substratos artificiais atingiram peso, sobrevivência e biomassa final significativamente

maior ($p < 0,05$) do que nas gaiolas onde não foram instalados substratos artificiais (Tabela 1).

Tabela 1 - Média (\pm dp) do peso, sobrevivência e biomassa final dos camarões cultivados em gaiolas com substratos (CS) e gaiolas sem substratos (SS) durante 30 dias.

Tempo	Peso (g)				Sobrev. (%)	Biomassa (g/m ²)
	0d	10d	20d	30d		
CS	0.017 \pm 0.006	0.092 \pm 0.040	0.370 \pm 0.110 ^a	0.723 \pm 0.158 ^a	95.43 \pm 1.62 ^a	206.10 \pm 3.50 ^a
SS	0.018 \pm 0.007	0.091 \pm 0.037	0.331 \pm 0.107 ^b	0.654 \pm 0.196 ^b	90.73 \pm 2.30 ^b	176.90 \pm 4.54 ^b

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

O biofilme formado sobre os substratos artificiais era composto principalmente por diatomáceas, cianobactérias filamentosas, protozoários e nematódeos. A predação do camarão sobre o biofilme afetou a comunidade de diatomáceas, sendo observado um consumo seletivo das diatomáceas cêntricas em relação às penadas e também causou um aumento significativo na concentração de clorofila *a*, provavelmente porque o consumo do biofilme pelo camarão abriu espaços nos substratos permitindo a manutenção do crescimento das microalgas na sua fase exponencial. Ao final do experimento foi notada uma redução no número de nematódeos do biofilme. Os resultados deste experimento demonstraram um efeito positivo da maior quantidade de substratos artificiais e biofilme sobre o desempenho dos camarões cultivados. Adicionalmente foi evidenciada a seletividade do camarão por determinados itens do biofilme, como diatomáceas cêntricas e nematódeos.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO BIOFILME NO CULTIVO DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* EM CERCADOS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS ^{1,2}

¹ Artigo no formato de submissão para a revista Atlântica

² A forma integral deste estudo encontra-se no Anexo II desta Tese.

Resumo

Juvenis de *Farfantepenaeus paulensis* foram cultivados, na densidade de estocagem de 20 camarões/m², em cercados (área de fundo = 50m²) no estuário da Lagoa dos Patos em dois tratamentos com três repetições: CS – onde foram adicionados substratos artificiais (telas de polietileno com abertura de malha de 1 mm) para aumentar a área para desenvolvimento de biofilme em aproximadamente 100 % e SS – onde não foram adicionados substratos. Durante o cultivo, a biomassa e composição do biofilme foram monitoradas. Após 86 dias, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) no desempenho dos camarões cultivados nos dois tratamentos (Tabela 1). Entretanto, o monitoramento da clorofila *a*, peso seco e composição de microorganismos indicou que os camarões consumiram o biofilme aderido aos substratos. Reduções significativas no número de nematódeos > 500 µm, tintinídeos, vorticelídeos e rotíferos presentes no biofilme sugerem uma possível seletividade dos camarões por estes microorganismos. Além disso, a redução na concentração de clorofila *a* indicou também um consumo das microalgas pelos camarões. Os resultados deste estudo sugerem que o consumo do biofilme pelos camarões foi acentuado após seis semanas de cultivo, provavelmente devido à redução na densidade de organismos bentônicos presentes no sedimento. Apesar do aumento de 100 % na área disponível para fixação de biofilme não ter proporcionado melhoria no desempenho final dos camarões cultivados, os períodos em que foram observadas maiores reduções no número de microorganismos do biofilme coincidiram com as maiores taxas de crescimento observadas para os

camarões. A presença dos substratos dos cercados de cultivo (onde naturalmente ocorre o crescimento de biofilme) e a baixa densidade de estocagem de camarões, empregadas neste estudo, podem ter reduzido o benefício do uso de substratos extras para disponibilização de maior quantidade de biofilme, talvez impedindo a detecção de diferenças significativas nos parâmetros de crescimento entre cultivos que utilizam ou não de substratos verticais. Portanto, é recomendado que sejam realizados estudos com densidades de estocagem mais altas, onde provavelmente, o uso de substratos artificiais e biofilme possam colaborar para melhoria no desempenho de *F. paulensis*.

Tabela 1 – Valores médios (\pm DP) de peso final (g), sobrevivência (%), biomassa final (g/m^2) e taxa de conversão alimentar aparente (TCA) no cultivo de *Farfantepenaeus paulensis* em cercados com e sem substrato artificial. Diferenças significativas entre os tratamentos não foram encontradas ($p > 0,05$).

Tratamento	Peso Final	Sobrevivência	Biomassa	TCA
Com Substrato	11,17 \pm 1,72	79,4 \pm 3,0	177,3 \pm 6,2	1,63 \pm 0,18
Sem Substrato	10,99 \pm 1,87	85,6 \pm 10,1	187,3 \pm 14,4	1,65 \pm 0,18

CAPÍTULO 3

**IMPORTÂNCIA DO BIOFILME COMO FONTE DE ALIMENTO PARA O
CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* AVALIADA ATRAVÉS DE
ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO ($\delta^{13}\text{C}$) E NITROGÊNIO ($\delta^{15}\text{N}$)**

¹ Artigo publicado na revista Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

² A forma integral deste estudo encontra-se no Anexo III desta Tese.

Resumo

A contribuição do biofilme e de uma ração comercial para o crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivado em tanques instalados em laboratório (experimento 1) e em gaiolas instaladas no estuário da Lagoa dos Patos (experimento 2) foi avaliada através da técnica de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Através de equações de balanço de massa foi demonstrado que, no cultivo em gaiolas, o biofilme contribuiu com mais de 49 % do carbono e 70 % do nitrogênio assimilado pelas pós-larvas. Este dado sugere que a ração, apesar de consumida (conforme observado), não estava sendo incorporada adequadamente pelos camarões. No experimento realizado em tanques, foi determinado um fracionamento isotópico muito elevado em relação aos isótopos de carbono, por isso a análise foi restrita à contribuição do nitrogênio, sendo determinado que o biofilme contribuiu com até 29 % do nitrogênio incorporado pelos camarões. Uma possível explicação para o elevado fracionamento isotópico apresentado pelos camarões seria a ingestão seletiva de determinados microorganismos presentes no biofilme, que apresentam um sinal isotópico diferente da comunidade como um todo. Na Tabela 1 são apresentados os resultados sobre a contribuição do biofilme e da ração para a biomassa dos camarões cultivados nos experimentos 1 e 2.

Tabela 1 – Contribuição (%) de carbono (C) e nitrogênio (N) do biofilme e da ração para a biomassa de *Farfantepenaeus paulensis* cultivados em tanques (experimento 1) ou gaiolas (experimento 2)

Tempo (dias)	Fonte	Experimento 1		Experimento 2	
		C	N	C	N
15	Biofilme	-	29,47	37,42	55,54
	Ração	-	70,53	62,58	44,56
30	Biofilme	-	20,70	49,27	73,98
	Ração	-	79,30	50,73	26,02

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DAS FONTES ALIMENTARES UTILIZADAS PELO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* ATRAVÉS DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$)

¹ Artigo no formato de submissão para a revista Atlântica

² A forma integral deste estudo encontra-se no Anexo IV desta Tese.

Resumo

Através da técnica de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) foi calculado o fracionamento isotópico e foram estimadas as contribuições das diversas fontes alimentares utilizadas por juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivados em cercados no estuário da Lagoa dos Patos e por camarões selvagens, capturados na mesma região. Os resultados apontaram para um fracionamento isotópico de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) mais alto que o sugerido na literatura para espécies estuarinas (3,84 ‰), entretanto, em estudos anteriores com o *F. paulensis* já havia sido determinado um fracionamento isotópico elevado. Com base nestes resultados de fracionamento foi utilizado o programa IsoSource para estimar a contribuição das fontes alimentares utilizadas pelos camarões cultivados em cercados com fornecimento de ração (CR) ou sem fornecimento de ração (SR) (Tabela 1) e para camarões capturados (Tabela 2). Para fins de comparação os resultados foram calculados utilizando o fracionamento isotópico encontrado neste estudo e o fracionamento isotópico padrão (Tabelas 1 e 2). Os resultados confirmaram a importância dos organismos bentônicos como poliquetas e tanaidáceos para a dieta dos camarões e também confirmaram que o alimento de origem vegetal oferece pouca contribuição para a nutrição dos camarões. O consumo de biofilme, sedimento superficial e material em suspensão demonstrou contribuir significativamente para camarões cultivados e selvagens e ainda foi determinado que estes itens podem suprir as necessidades alimentares dos camarões cultivados na ausência da oferta de ração artificial. Além disso, foi confirmada a importância de se determinar previamente os fracionamentos

isotópicos de carbono e nitrogênio apresentados pelo organismo estudado, pois foram encontradas grandes diferenças em relação à contribuição das fontes alimentares ao ser utilizado o fracionamento padrão.

Tabela 1 – Percentual (média \pm dp) da contribuição das fontes alimentares analisadas para os camarões cultivados no cercado com suprimento de ração (CR) e no cercado sem suprimento de ração (SR), são apresentados os valores calculados através do programa IsoSource, considerando o fracionamento isotópico determinado neste estudo (3,84 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 2,44 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$) e o fracionamento isotópico sugerido por Peterson & Fry (1987) (1 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 3 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$ – valores em itálico). MS – material em suspensão; Bio + SS – contribuição agrupada do biofilme e do sedimento superficial presente nos cercados de cultivo.

		Fontes Alimentares Potenciais					
Tempo	Ração	<i>R.marítima</i>	Poliquetas	Tanaidáceos	MS	Bio + SS	
	15	*	*	*	*	*	
CR		<i>32,2\pm12,4</i>	<i>3,5\pm2,7</i>	<i>14\pm9,8</i>	<i>17,4\pm13,4</i>	<i>3,8\pm2,5</i>	<i>29,1\pm21,5</i>
	30	39,4 \pm 5,3	0,4 \pm 0,6	31,4 \pm 2,4	6,2 \pm 5	10,3 \pm 8	12,3 \pm 9,5
		<i>20,4\pm12,6</i>	<i>13,1\pm7,3</i>	<i>11,6\pm7,8</i>	<i>21,8\pm16,2</i>	<i>8,7\pm5,4</i>	<i>24,3\pm17,5</i>
	45	24,1 \pm 5,2	1,9 \pm 1,8	44 \pm 4,1	8,6 \pm 6,9	14,7 \pm 5,3	6,7 \pm 4,1
		<i>11,3\pm8,5</i>	<i>6,9\pm5,2</i>	<i>42,1\pm8,4</i>	<i>20,9\pm15,9</i>	<i>6,2\pm3,3</i>	<i>12,5\pm9,8</i>
SR	15	-	2,7 \pm 2,3	31,5 \pm 4,9	22,5 \pm 15,8	20,8 \pm 10,2	22,5 \pm 13,5
		-	<i>7,1\pm3,3</i>	<i>28\pm19,8</i>	<i>29,8\pm23</i>	<i>6,3\pm4,8</i>	<i>28,8\pm20,6</i>
	30	-	4,1 \pm 3	15,8 \pm 6	30,2 \pm 20	23,1 \pm 13,7	26,9 \pm 17,7
		-	<i>2,3\pm1,6</i>	<i>38,9\pm9,9</i>	<i>35,3\pm21,6</i>	<i>0,9\pm0,8</i>	<i>22,6\pm11,1</i>
	45	-	2,6 \pm 2,1	27,5 \pm 4,7	21,6 \pm 15,1	23,2 \pm 9,4	25,2 \pm 12,7
		-	<i>2\pm1,8</i>	<i>39,5\pm3,5</i>	<i>24,2\pm17,3</i>	<i>1,1\pm1,2</i>	<i>33,2\pm13,8</i>

* não foram encontradas soluções possíveis com o programa IsoSource.

Tabela 2 – Percentual (média \pm dp) da contribuição das fontes alimentares analisadas para os camarões capturados das classes 1 a 5, são apresentados os valores calculados através do programa IsoSource, considerando o fracionamento isotópico determinado neste estudo (3,84 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 2,44 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$) e o fracionamento isotópico sugerido por Peterson & Fry (1987) (1 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 3 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$ – valores em itálico). MS – material em suspensão; B + SS – contribuição agrupada do biofilme e do sedimento superficial presente nos cercados de cultivo.

	Fontes Alimentares Potenciais					
	<i>Scirpus spp</i>	<i>R. marítima</i>	Poliquetas	Tanaiáceos	MS	Bio + SS
C1	4,3 \pm 3,5	11 \pm 1,7	22,8 \pm 13,8	25 \pm 18,9	18,2 \pm 14	18,8 \pm 14
	2,1 \pm 1,9	51,8 \pm 1,6	29,5 \pm 2,4	7,6 \pm 6,3	4,2 \pm 3,5	4,8 \pm 4,1
C2	4,7 \pm 3,7	6,5 \pm 1,8	23 \pm 14,3	25,6 \pm 19,3	19,1 \pm 15,1	21 \pm 16,4
	3,3 \pm 2,9	44,8 \pm 2,4	24,6 \pm 3,7	12,5 \pm 10	6,5 \pm 5,4	8,3 \pm 6,8
C3	2,3 \pm 2,1	0,7 \pm 0,8	35,8 \pm 8	11,4 \pm 9,2	25,4 \pm 7,6	24,5 \pm 8,4
	3,7 \pm 3,3	30,1 \pm 2,7	35,8 \pm 4,2	13,9 \pm 11,2	7,5 \pm 6,1	9,1 \pm 7,5
C4	0,9 \pm 1	0,2 \pm 0,4	44,5 \pm 4,1	16 \pm 4,8	18,5 \pm 3,6	19,9 \pm 4,2
	2,7 \pm 2,5	27,3 \pm 2,1	47,1 \pm 3,3	10,9 \pm 8,9	5,4 \pm 4,7	6,6 \pm 5,6
C5	1,3 \pm 1,3	0,3 \pm 0,4	38 \pm 5	15,7 \pm 6	23,4 \pm 4	21,5 \pm 5
	4,9 \pm 4,2	27,2 \pm 3,5	28,6 \pm 5,4	18,3 \pm 14,5	9,4 \pm 7,8	11,6 \pm 9,4

classes de tamanho: C 1 – de 0,5 a 1 grama; C 2 – de 1 a 3 gramas; C 3 – de 3 a 6 gramas; C 4 – de 6 a 9 gramas e C 5 – de 9 a 12 gramas

CAPÍTULO 5

EFEITO DE DIETAS PRÁTICAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA NO DESEMPENHO DE JUVENIS DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* CULTIVADOS DURANTE A FASE DE BERÇÁRIO EM UM SISTEMA INTENSIVO, SEM RENOVAÇÃO DE ÁGUA COM FLOCOS MICROBIANOS

¹ Artigo submetido para a revista Aquaculture Nutrition

² A forma integral deste estudo encontra-se no Anexo V desta Tese.

Resumo

Estudos anteriores determinaram que o nível ideal de proteína para a ração utilizada durante o cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em água clara é de 45 %. Neste experimento, os camarões foram cultivados em um sistema intensivo, sem renovação de água e com flocos microbianos com o objetivo de determinar se a presença de alimento natural na forma de flocos microbianos poderia reduzir a exigência protéica do *F. paulensis*. Os camarões foram alimentados com dietas práticas contendo diferentes quantidades de proteína bruta (25, 30, 35, 40 e 45 % PB). O desenvolvimento dos flocos microbianos no tanque de cultivo foi promovido através do uso de aeração forte e da fertilização com ração comercial para camarão, farelo de trigo e melação, em uma relação de Carbono e Nitrogênio final de aproximadamente 20:1. Os flocos eram compostos por detritos orgânicos colonizados por bactérias heterotróficas, cianobactérias cocóides e filamentosas, protozoários e rotíferos. A análise proximal dos flocos microbianos determinou um conteúdo protéico de 30,4 %. Os resultados do desempenho dos camarões cultivados após 45 dias podem ser visualizados na Tabela 1. Foi demonstrado que quando o cultivo é realizado em meio aos flocos microbianos é possível reduzir o conteúdo protéico da ração para 35 % sem afetar o desempenho dos camarões. Os resultados deste estudo apontam para a possibilidade do cultivo de *F. paulensis* em um sistema sem renovação de água que não compromete o ambiente aquático adjacente e ainda demonstraram a possibilidade de reduzir a utilização de farinha de peixe como fonte de proteína da ração.

Tabela 1 – Média (\pm dp) da sobrevivência (S; %), peso final (PF; gramas), ganho de peso (GP; gramas), taxa de crescimento instantâneo (G), taxa de conversão alimentar (TCA) e eficiência protéica (EP) de *Farfantepenaeus paulensis* cultivados em um sistema intensivo, sem renovação de água, com flocos microbianos e alimentados com dietas práticas contendo diferentes níveis de proteína bruta.

	Percentual de Proteína das Rações					P value
	25%	30%	35%	40%	45%	
S	95,13 \pm 4,21	95,21 \pm 3,90	89,96 \pm 8,70	92,73 \pm 0,05	96,33 \pm 3,65	0,892500
PF	0,56 \pm 0,12 ^a	0,57 \pm 0,12 ^a	0,68 \pm 0,13 ^b	0,68 \pm 0,11 ^b	0,66 \pm 0,11 ^b	0,000003
GP	0,49 \pm 0,12 ^a	0,50 \pm 0,12 ^a	0,61 \pm 0,13 ^b	0,61 \pm 0,11 ^b	0,58 \pm 0,11 ^b	0,000003
G	0,045 \pm 0,005 ^a	0,045 \pm 0,004 ^a	0,049 \pm 0,004 ^b	0,050 \pm 0,003 ^b	0,049 \pm 0,003 ^b	0,000001
TCA	2,64 \pm 0,002 ^a	2,58 \pm 0,03 ^a	2,30 \pm 0,10 ^b	2,22 \pm 0,12 ^b	2,17 \pm 0,06 ^b	0,000046
EP	1,51 \pm 0,08 ^a	1,30 \pm 0,006 ^{ab}	1,25 \pm 0,18 ^{ab}	1,13 \pm 0,08 ^b	1,02 \pm 0,07 ^b	0,002703

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

CONCLUSÕES GERAIS

Capítulo 1

Os resultados do capítulo 1 demonstraram que a utilização de substratos artificiais para aumentar a área para desenvolvimento de biofilme durante o cultivo de pós-larvas de *F. paulensis* em gaiolas instaladas no estuário da Lagoa dos Patos aumentou significativamente a sobrevivência e o crescimento dos camarões nesta fase do cultivo. Além disso, foi demonstrado que a predação dos camarões sobre o biofilme formado nos substratos resultou no aumento da concentração de clorofila do biofilme e na redução de diatomáceas cêntricas e nematódeos, indicando uma possível seletividade dos camarões por estes microorganismos.

Capítulo 2

Os resultados apresentados no capítulo 2 demonstraram que os juvenis cultivados em cercados consumiram o biofilme formado sobre os substratos artificiais e apresentaram seletividade por determinados microorganismos, como nematódeos, rotíferos e protozoários ciliados (vorticelídeos e tintinídeos). A predação dos camarões sobre o biofilme foi mais acentuada após a sexta semana de cultivo, provavelmente devido à redução na quantidade de organismos bentônicos presentes nos cercados. Também foi observado que, nos períodos de maior predação dos camarões sobre o biofilme, os camarões apresentaram taxa de crescimento significativamente maior. Apesar disto e, provavelmente, devido à baixa densidade de camarões empregada (20/m²) e a

formação de biofilme nas panagens do próprio cercado, o aumento de aproximadamente 100 % na área disponível para desenvolvimento do biofilme não resultou em desempenho superior dos camarões cultivados. Provavelmente o uso de substratos artificiais poderia trazer maiores benefícios quando o cultivo é realizado em densidades de estocagem maiores.

Capítulo 3

No capítulo 3 foi demonstrada a contribuição do biofilme formado em tanques de cultivo ou em substratos artificiais inseridos em gaiolas de cultivo para o crescimento dos camarões cultivados. As equações de balanço de massa mostraram que, no experimento 1, até 29,47 % do carbono utilizado pelo camarão era originado do biofilme e no experimento 2 foi possível estimar uma contribuição do biofilme de até 49,27 % de carbono e 73,98 % de nitrogênio. Também foi observado um fracionamento isotópico para o Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) mais elevado do que o intervalo sugerido para espécies estuarinas, o que levou a ser realizado um experimento específico para estimar mais precisamente o fracionamento isotópico apresentado por *F. paulensis* (capítulo 4).

Capítulo 4

O experimento realizado para determinação do fracionamento isotópico de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) apresentado pelo *F. paulensis* confirmou que este camarão apresenta um maior fracionamento do que outros organismos estuarinos em geral. No experimento realizado durante o cultivo em cercados foram

confirmadas a importância da contribuição dos organismos bentônicos e também do biofilme, sedimento superficial e material em suspensão como importantes fontes de alimento para os camarões. Em relação ao material de origem vegetal foi confirmado que este não é uma fonte nutricional muito importante para o *F. paulensis*. Em relação aos camarões capturados foi verificado que, apesar de grandes diferenças de tamanho (0,6 – 9 gramas), estes se valem de praticamente as mesmas fontes de alimento e também foi confirmada a importância dos organismos bentônicos e do biofilme, do sedimento superficial e do material em suspensão como fontes de alimentares para os camarões selvagens.

Capítulo 5

O resultado do experimento de cultivo em meio aos flocos microbianos demonstrou a importância dos microorganismos presentes nos flocos como fonte nutricional e principalmente de proteína para os camarões cultivados. A exigência protéica de *F. paulensis*, antes estimada em 45 % no cultivo em água clara, pode ser reduzida para 35 % quando o cultivo é realizado neste tipo de sistema. Neste experimento foi demonstrada a possibilidade do cultivo em um sistema sem renovação de água, com baixo impacto ambiental e a possível redução na dependência da farinha de peixe como fonte de proteína para o cultivo de camarões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a realização dos experimentos que constituem esta tese foram utilizadas diferentes abordagens para estimar a contribuição dos microorganismos como fonte de alimento para os camarões. Inicialmente foi dada maior atenção às comunidades de microorganismos presentes no biofilme e ao efeito que elas podem produzir quando disponibilizadas para o consumo dos camarões. Os resultados indicaram que o camarão realmente utiliza o biofilme como alimento e que isto pode produzir benefícios em termos de maior sobrevivência e crescimento das pós-larvas cultivadas, mas que, para juvenis de maior porte, o biofilme, apesar de consumido e de melhorar a taxa de crescimento dos camarões, deve ser disponibilizado em maior quantidade ou poderá mostrar maiores benefícios quando o cultivo é realizado em densidades de estocagens maiores.

Em ambas as fases de cultivo onde foi estudado o efeito do biofilme, berçário (capítulo 1) e engorda (capítulo 2), foi observado o consumo seletivo dos camarões por determinados microorganismos ali presentes. Isto indica que poderemos explorar os benefícios destes microorganismos de maneira mais ampla se, através de manipulação das comunidades microbianas presentes nos ambientes de cultivo, for aumentada a disponibilidade dos itens mais apreciados pelos camarões. Isto pode ser feito através de inoculações periódicas ou procurando estabelecer as melhores condições para que os microorganismos benéficos se desenvolvam.

Em um segundo momento foi utilizada a técnica de isótopos estáveis para estimar a contribuição do biofilme para o crescimento dos camarões. Os resultados confirmaram a importância do uso de biofilme em sistemas de cultivo, atestando que os camarões realmente podem assimilar em seus tecidos os nutrientes disponibilizados pelos microorganismos do biofilme. Além disso, quando a técnica de isótopos estáveis foi utilizada para estimar a contribuição de todas as potenciais fontes alimentares disponíveis para *F. paulensis*, tanto em cultivo, quanto no ambiente natural, sendo confirmada a importância do biofilme, ao mesmo tempo em que também ficou demonstrado que os microorganismos e a matéria orgânica presentes no sedimento superficial e no material em suspensão contribuem de maneira importante para o crescimento dos camarões. Talvez a constatação mais interessante seja a da contribuição do material em suspensão, pois, sendo o camarão um organismo bentônico, teoricamente este não se valeria tanto do material particulado em suspensão, principalmente no caso de camarões maiores com tamanho acima de 6 gramas, entretanto as análises mostraram que a matéria em suspensão pode contribuir com mais de 20 % da biomassa destes camarões.

Os resultados do cultivo do camarão-rosa em sistema fechado com flocos microbianos confirmaram a capacidade de utilização do material particulado em suspensão como fonte alimentar por este camarão. Além disso, a análise da composição microbiana dos flocos mostrou que microorganismos considerados importantes para a nutrição de camarões, como as diatomáceas e os nematódeos, os quais inclusive surgiram como itens preferencialmente ingeridos pelo camarão em nossos estudos, não estavam presentes em

quantidades significativas na comunidade microbiana dos flocos. Isto indica que, através da manipulação destes microorganismos é possível melhorar ainda mais a qualidade nutricional dos flocos microbianos e possivelmente potencializar o desempenho do *F. paulensis* neste tipo de cultivo.

É importante ressaltar que, atualmente, o cultivo de camarões marinhos está sendo direcionado para sistemas ambientalmente amigáveis, onde não existe emissão de efluentes nem risco de disseminação de patógenos. Por isto, a importância da manipulação microbiana deve aumentar neste tipo de sistema de cultivo, pois os microorganismos ali presentes são os principais responsáveis pela manutenção da qualidade da água e pela nutrição dos camarões cultivados.

De maneira geral, os resultados dos estudos que compõe esta Tese confirmaram a hipótese de que os microorganismos são uma importante fonte de alimento para o camarão-rosa *F. paulensis*. A contribuição dos microorganismos foi constatada tanto para ambiente de cultivo quanto para camarões selvagens capturados no estuário da Lagoa dos Patos e cobriu uma ampla faixa de tamanho dos camarões cultivados e coletados.

BIBLIOGRAFIA

- ABREU, PC, CSB COSTA, C BEMVENUTI, C ODEBRECHT, W GRANÉLI & AM ANÉSIO. 2006. Eutrophication processes and trophic interactions in a shallow estuary: preliminary results base on stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Estuaries and Coasts*, 29 (2):277-285
- AKIYAMA, D, WG DOMINY & AL LAWRENCE. 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: FAST, AW & LJ LESTER. Marine shrimp culture: principles and practices. Elsevier, Amsterdam. P. 535-568.
- ANDERSON, RK, PL PARKER & AL LAWRENCE. 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by commercially important shrimp *Penaeus vannamei* in a pond growout system. *J. World Aquac. Soc.*, 18: 148-155.
- AVNIMELECH, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
- AVNIMELECH, Y. 2000. Protein utilization in aquaculture systems. Inter. Conf. AQUA 2000, Nice, France, May 2-6, 2000. 41p.
- AZAM, F, S HASKELL & F ROHWER. 2002. The microbial loop in aquaculture. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 6: 87-94.
- AZIM, ME, MA WAHAB, AA VAN DAM, MCM BEVERIDGE & VERDEGEM. 2001. The potencial of periphyton-based culture of two Indian major carps,

- rohu *Labeo rohita* (Hamilton) and gonia *Labeo gonius* (Linnaeus). *Aquac. Res.*, 32: 209-216.
- BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RC CAVALLI, MHS SANTOS & PC ABREU. 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistemas de berçário. *Atlântica*, 25,117-122).
- BALLESTER, ELC, DW MUTTI, CN FRÓES, LH POERSCH, TG MACHADO & WJr WASIELESKY. 2007. Larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. In: XII COLACMAR - Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar, 2007, Florianópolis. XII COLACMAR, 2007.
- BARBIERI, RC & A. OSTRENSKY. 2002. Camarões marinhos – engorda. Viçosa, Aprenda Fácil. 370p.
- BENVENUTI, CE. 1987. Predation effects on a benthic community in estuarine soft sediments. *Atlântica*, 9, 33-63
- BOYD, CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226, 101-112.
- BRATVOLD, D & CL BROWDY. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMatsTM) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195: 81-94.
- BURFORD, MA, PJ THOMPSON, RP McINTOSH, RH BAUMAN & DC PEARSON. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 2219, 393-411.
- BURFORD, MA, DM SMITH, SJ TARBRETT, FE COMAN, PJ THOMPSON, MC BARLLAY & PJ TOSCAS. 2004. The effect of dietary protein on the

- growth and survival of the shrimp *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquac. Nutr.*, 10: 15-23
- CASTELLO, JP & OOJ MÖLLER. 1978. On the relationship between rainfall and shrimp production in the estuary of the Patos Lagoon (Rio Grande do Sul, Brasil). *Atlântica*, 3: 67-74.
- CAVALLI, RO, M SCARDUA & WJr WASIELWSKY. 1997. Reproductive performance of different-sized wild and pond reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquac. Soc.*28(3): 260-267.
- CAVALLI, RO, SM PEIXOTO & WJr ASIELESKY. 1998. Performance of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante) broodstock under long-term exposure to ammonia. *Aquac. Res.*, 29:815-822.
- COMAN, FE, RM CONNOLLY, SE BUNN & NP PRESTON. 2006. Food sources of the sergestid crustacean, *Acetes sibogae*, in shrimp ponds. *Aquaculture*, 259, 222-253.
- DECAMP, O, L CONQUEST, I FORSTER & AGJ TACON. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 5: 79-84.
- D'INCAO, F. 1983. Estudo do Crescimento e da Mortalidade de *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis* Pérez-Farfante, 1967, na Lagoa dos Patos,

- RS, Brasil. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- D'INCAO, F. 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica*, 13: 159-169
- D'INCAO, F. 1995. Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Dendobranchiata (Crustacea Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental. Curitiba, UFP. (Tese de Doutorado) 365p.
- D'INCAO, F & EG Reis. 2002. Community-based management and technical advice in Patos Lagoon estuary (Brazil). *Ocean Coast. Manage.* 45, 531-539.
- D'INCAO, F, H VALENTINI & LF RODRIGUES. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Atlântica*, 20: 103-116.
- EBELING, JM, MB TIMMONS & JJ BISOGNI. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346-358.
- EMERENCIANO, MGC. 2007. Flocos microbianos: aspectos zootécnicos no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Dissertação de Mestrado, FURG, Rio Grande, RS.
- EMERENCIANO, MGC, WJr WASIELESKY, SOARES, RB, BALLESTER, ELC, IZEPI, EM & CAVALLI, RO. 2007. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 29, 1-7.
- EPP, MA. 2002. Stable isotopes in shrimp aquaculture. *World Aquacul.* 33, 18–19.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2007. The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 180p.
- FRÓES, CN, M ABE, W Jr WASIELESKY, CH PRENTICE & RO CAVALLI. 2006. Efeitos de dietas práticas com diferentes níveis de proteína bruta na sobrevivência e crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). *Atlântica*, 29, 25-34.
- FRY, B. 2006. Stable isotope ecology. Springer, New York, USA. 308pp.
- HOBBIE, JE, RJ DALEY & S JASPER. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *App. And Environ. Microb.*, 3: 1225-1228.
- HOPKINS, JS, PA SANDIFER & CL BROWDY. 1995. Effect of two feed protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. *J. World Aquac. Soc.*, 26, 93–97.
- HOROWITZ, S & A HOROWITZ. 2002. Microbial intervention in Aquaculture. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 9: 119-129.
- IWAI, M. 1978. Desenvolvimento larval e pós-larval de *Penaeus* (Melicertus) *paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda) e o ciclo de vida

- dos camarões do gênero *Penaeus* da região centro-sul do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- JENSEN, LV, WJr WASIELESKY, ELC BALLESTER, RO CAVALLI & MS SANTOS. 2006. Role of the microalgae *Thalassiosira fluviatilis* in weight gain and survival of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* reared in indoor nursery tanks. *Nauplius*, 14, 37-43
- JORGENSEN, P. 1998. Cultivo de *Penaeus paulensis* em cercados experimentais em uma enseada estuarina da Lagoa dos Patos, Brasil: Respostas da Associação de Macroinvertebrados bentônicos. Rio Grande, FURG. (Dissertação de Mestrado) 227p.
- KJERFVE, B. 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons. In: WOLFE, DA (ed), Estuarine variability. Academic Press, New York, pp 63-81.
- LANGIS, R, D PROULX, J DE LA NOÛE & P COUTURE. 1988. Effects of a bacterial biofilm on intensive *Daphnia* culture. *Aquacultural Engineering*, 7: 21-38.
- MARCHIORI, MA. 1996. Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. Rio Grande, Editora da FURG. 79p.
- McABEE, BJ, CL BROWDY, RJ RHODES & AD STOKES. 2003. The use of greenhouse-enclosed raceway systems for the superintensive production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. *Glob. Aquac. Advocate*, 6 (4), 40-43.

- McCUTCHAN, JHJr, WMJr LEWIS, C KENDALL & CCMcGRATH. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen and sulfur. *OIKOS*, 102, 378-390.
- McINTOSH, RP. 2000. Changing paradigms in shrimp farming: IV. Low protein feeds and feeding strategies. *Glob. Aquac. Advocate*, 3 (2), 44-50.
- MORIARTY, DJW. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151: 333-349.
- MOSS, SM. 2002. Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 1: 1-9.
- MOSS, KRK & SM MOSS. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 35(4): 537-542.
- MRIDULA, RM, JK MANISSERY, P KESHAVANATH, KM SHANKAR MC NANDEESHA & KM RAJESH. 2003. Water quality, biofilm production and growth of fringe-lipped carp (*Labeo fimbriatus*) in tanks provided with two solid substrates. *Biores. Techn.*87: 263-267.
- NAYLOR, RL, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSK, MCM BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCOI, H MOONEY & M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017-1024.

- NUNES, AJP, TCV GESTEIRA & S GODDARD. 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*, 149: 121-136.
- PEIXOTO, S, WJr WASIELESKY & L LOUZADA. 2003. Comparative analysis of pink shrimp, *Farfantepenaeus paulensis*, and Pacific Whiteshrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture in extreme southern Brazil. *J. Ap. Aquac.*, 14, 47-56.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI & WJr WASIELESKY. 2005. Recent developments on broodstock maturation and reproduction of *Farfantepenaeus paulensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 6, p. 997-1006, 2005.
- PÉREZ-FARFANTE, I & B KENSLEY. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Éditions du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Éditions du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.
- PETERSON, BJ & B FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 293-320.
- PHILLIPS, DL. 2001. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia*, 127, 166-170.
- PHILLIPS, DL & JW GREGG. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127, 171-179.
- PHILLIPS, DL & JW GREGG. 2003. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too many sources. *Oecologia*. 136: 261-269

- PRETO, AL, RO CAVALLI, T PISSETTI, PC Abreu, & W Wasielesky. 2005. Efeito da densidade de estocagem sobre o biofilme e o desempenho de pós-larvas do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivadas em gaiolas. *Ciência Rural* 35, 1417–1423.
- RAMESH, MR, KM SHANKAR, CV MOHAN & TJ VARGHESE. 1999. Comparison of three plant substrates for enhancing carp growth through bacterial biofilm. *Aquacultural Engineering*, 19: 119-131.
- REIS, EG, & F D'INCAO. 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. *Ocean & Coastal Management*, 43: 585-595.
- SAMOCHA, TM, S PATNAIK, M SPEED, AM ALI, JM BURGER, RV ALMEIDA, Z AYUB, M HARISANTO, A HOROWITZ & DL BROCK. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Eng.*, 36, 184-191.
- SANTOS, MH. 2003. Alimentação do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) (Decapoda-Penaeidae) cultivado. Rio Grande, Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica. – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 229p.
- SHERR, BF & EB SHERR. 1984. Role of heterotrophic protozoa in Carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In: KLUG, MJ & CA REDDY (eds.). *Current Perspectives in Microbial Ecology*, Na. Soc. Microbiol., Washington DC, 412-423.

- SILVA, DL & F D'INCAO. 2000. Análise do conteúdo estomacal de *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante,1967) do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil (Decapoda: Penaeidae). In: Relatório do Projeto Avaliação e gerenciamento da pesca de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos. Ed. D'Incao F., Brazil, pp. 89-102.
- SOARES, RB, S PEIXOTO, W WASIELESKY & F D'INCAO. 2005. Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 322: 167-176.
- SOARES, RB, S PEIXOTO, W WASIELESKY & F D'INCAO. Effects of feeding plant material on growth and survival of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica* (no prelo).
- STONER, AW & RJ ZIMMERMAN. 1988. Food pathways associated with penaeid shrimps in a mangrove-fringed estuary. *Fish. Bull.*, 86(3):543-551.
- TACON, AGJ. 1999. Aquafeeds and the Oceanic Institute's AQUAFAN Program. *Gl. Aquac. Advoc.* 2(6): 14-16.
- THOMPSON, F L, PC ABREU & R CAVALLI. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture.*, 174: 139-153.
- THOMPSON, FL, PC ABREU. & WJr WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- TIDWELL, JH, S COYLE, A VANARNUM & C WEIBEL. 2000. Production response of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* to increasing amounts of artificial substrate in ponds. *J. World Aquac. Soc.*, 31(3): 452-458.

- UMESH, NR, SHANKAR & CV MOHAN. 1999. Enhancing growth of common carp, rohu and Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm. *Aquac. Int.*, 7: 251-260.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnologie*, 9: 1-38.
- VALENTINI, H, F D'INCAO, LF RODRIGUEZ JEN REBELO & E RAHN. 1991. Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Atlântica*, 13(1): 143-157.
- WASIELESKY, WJr, LH POERSCH, L JENSEN & A BIANCHINI. 2001. Effect of stocking density on pen reared pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) (Decapoda, Penaeidae). *Nauplius*, 9 (2): 163-167.
- WASIELESKY, WJr, S PEIXOTO, L JENSEN, L POERSCH & A BIANCHINI. 2004. Estudo preliminar do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em cercados no estuário da Lagoa dos Patos. *B. Inst. Pesca*, 30, 63-70.
- WASIELESKY, WJr, H ATWOOD, A STOKES & CL BROWDY. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-403.
- YOKOYAMA, H, A TAMAKI, K HARADA, K SHIMODA, K KOYAMA & Y ISHIHI. 2005. Variability of diet-tissue isotopic fractionation in estuarine macrobenthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 296, 115-128.