

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E
PESCA INTERIOR – BADPI

***Moina micrura* Kurtz 1874, (Crustacea: Anomopoda): Alternativa de
alimento vivo para larvicultura de peixes amazônicos**

Renan Gomes do Nascimento

Manaus-Amazonas

Fevereiro-2019

RENAN GOMES DO NASCIMENTO

***Moina micrura* Kurtz 1874, (Crustacea: Anomopoda): Alternativa de alimento vivo para larvicultura de peixes amazônicos**

Orientador: Dr. Edinaldo Nelson dos Santos Silva

Co-orientador: Dr. Adolfo José da Mota

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus-Amazonas

Fevereiro-2019

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por todo apoio;

Ao meu orientador Nelson, pelos ensinamentos, apoio e orientação;

Ao meu coorientador Mota e sua equipe do Laboratório de Biotecnologia UFAM, pelos ensinamentos, apoio e orientação;

À minha namorada Raize, pelo apoio, paciência e amor;

Aos companheiros do Laboratório de Plâncton;

A todos meus colegas de turma (BADPI/2017);

À Dr. Lígia e sua equipe do projeto Gigas, por todo o apoio;

Ao Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica INPA;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e seus funcionários e pesquisadores pelo apoio;

Ao programa de Pós Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia;

Ao CNPQ, pela bolsa de estudo concedida.

Resumo

No que diz respeito à produção de alimento vivo, o cultivo em grande escala do zooplâncton sempre foi um fator limitante nas práticas da aquicultura. Os locais designados para a produção do zooplâncton normalmente são tanques, que são fertilizados com nutrientes orgânicos ou inorgânicos, para proporcionar o desenvolvimento de microalgas e assim suportar o crescimento do zooplâncton. A composição e densidade das microalgas no ambiente tem sido relatado como um dos principais fatores controladores do crescimento populacional do zooplâncton durante o cultivo, uma vez que a baixa disponibilidade desse recurso diminui o número de progênies produzidas, além de mudar o modo reprodutivo dos cladóceros de reprodução assexuada para sexuada, na qual as fêmeas produzem no máximo duas progênies, que entram em dormência. A produção das formas de resistência tem uma série de implicações envolvendo tanto a produção do próprio zooplâncton como o zooplâncton como alimento vivo para o sucesso da larvicultura. Portanto, compreender o papel dessas formas para a produção do zooplâncton como alimento vivo, além de entender em quais condições o zooplâncton passa a produzir as formas dormentes foi o objetivo desse estudo. Para entender o papel das formas dormentes no processo de cultivo, foi utilizado um tanque (9,6x4,8x0,9m) do INPA. No tanque, foram realizadas coletas para estimativa da densidade do fitoplâncton, coletas do sedimento tanto para estimativa da densidade quanto para eclosão diária das formas de resistência, além da coleta das formas dormentes produzidas pela comunidade ativa no tanque. Para entender em quais condições o zooplâncton passa a produzir as formas dormentes, nós testamos o efeito de diferentes densidades de fitoplâncton (A1 5×10^3 , A2 5×10^4 , A3 5×10^6 cells/mL) e diferentes densidades (densidade inicial C1 5, C2 15 e C3 30 organismos) na produção de formas de resistência em *Moina micrura*. Foi estimado uma densidade de 1,18 de efípios/g de sedimento. A taxa média de eclosão foi de 20,8 indivíduos m^{-2} dia⁻¹. A taxa média de produção foi de 164,5 formas de resistência m^{-2} dia⁻¹. As formas de resistência presentes nos sedimentos são determinantes para o sucesso na produção do zooplâncton. A densidade do fitoplâncton foi preponderante para a reprodução assexuada prevalecer na população durante o período de estudo. Não encontramos relação entre o aumento da densidade populacional e a produção de formas de resistência neste estudo.

Abstract

As far as we know about live feeds production, it has always been the most limitation factor to large-scale zooplankton cultivation in aquaculture practices. The sites designated for the zooplankton production are usually tanks that are fertilized with organic or inorganic nutrients to provide the development of microalgae to feed and support the growth of zooplankton. Microalgae composition and density has been reported to be one of the main controlling factors for zooplankton's population growth during cultivation, knowing that the low availability of this resource decreases the number of produced progenies and can even change the cladocera's reproduction type, from asexual reproduction to sexual, where the females produce at most two progenies, that go into dormancy. Resting eggs production leads to several implications involving both the production of zooplankton itself and zooplankton as a living food for the success of larviculture stage. That way, understanding the role of these forms for the zooplankton's production as a live feed, besides of perceiving under what conditions the zooplankton produces dormant forms, was the purpose of this study. To understand this role of resting eggs in the cultivation process, a tank (9.6x4.8x0.9m) of INPA was used. In the tank, sampling was done and used to estimate density of phytoplankton, sediment sampling for both density estimation and daily hatching of resting eggs, as well as the collection of resting eggs produced by the active community in the tank. In order to understand under what conditions zooplankton starts producing this eggs, the effect of different densities of phytoplankton were tested (A1 5×10^3 , A2 5×10^4 , A3 5×10^6 cells / mL) and also different densities of zooplankton (initial density C1 5, C2 15 and C3 30 organisms), in the production of resistance forms in *Moina micrura*. The estimated density was 1.18 effipios/g in sediment. The mean hatching rate was 20.8 individuals $m^{-2} \text{ day}^{-1}$. The production's average rate was 164.5 resting eggs $m^{-2} \text{ day}^{-1}$. The resting eggs present in the sediments are determinant for the success in zooplankton production. The density of phytoplankton was preponderant for asexual reproduction prevailing in the population during the period of study. We didn't find relation between the increase in population density and the production of resting eggs in this study.

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I.....	vi
LISTA FIGURAS CAPÍTULO II.....	vi
Introdução Geral.....	1
Objetivos.....	4
Organização da dissertação.....	5
Referências.....	5
Capítulo I.....	10
FORMAS DE RESISTÊNCIA DE CLADÓCEROS: IMPLICAÇÕES PARA AQUICULTURA.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	11
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Espécie alvo.....	13
Método geral de obtenção dos dados.....	14
1-Estimativa da densidade de efípios no sedimento.....	14
2-Estimativa da taxa de eclosão dos efípios do sedimento do tanque.....	15
3 - Estimativa da taxa de produção de efípios dos cladóceros do tanque.....	16
Análise da morfológica externa do efípio.....	18
Resultados.....	18
Densidade de ovos do sedimento do tanque.....	18
Taxa de eclosão diária dos ovos de resistência do sedimento.....	19
Taxa de produção diária de ovos de resistência e densidade de <i>M. micrura</i> e algas.....	19
Morfologia externa do efípio.....	20
Discussão.....	22
Densidade de efípios no sedimento do tanque.....	22
Taxa diária de eclosão das formas dormentes do sedimento.....	23
Produção de formas dormentes no tanque.....	24
Considerações finais.....	25
Conclusão.....	25
Referências bibliográficas.....	25

Capítulo II.....	30
EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE OVOS DE RESISTÊNCIA DE <i>Moina micrura</i> KURTZ, 1984, EM CULTIVOS EXPERIMENTAIS	
Indicador não definido. Erro!	
Resumo	30
Abstract	31
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	33
Coleta e aclimação de <i>Moina micrura</i>:	33
Coleta e aclimação de <i>Chlorella vulgaris</i>:	34
Experimento de indução a produção de ovos de resistência de <i>M. micrura</i> sobre diferentes concentrações de alimento:	34
Experimento de indução a produção de ovos de resistência de <i>M. micrura</i> sobre diferentes densidade de <i>M. micrura</i>:	35
Análise estatística	36
Resultados.....	36
Experimento de indução a produção de ovos de resistência de <i>M. micrura</i> sobre diferentes concentrações de alimento:	36
Experimento de indução a produção de ovos de resistência sobre diferentes densidade de <i>M. micrura</i>:	38
Discussão	39
Conclusão.....	41
Referências	41

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

Figura 1. Tanque utilizado no estudo (9,6x4,8x0,9m). Localizado na Estação de Aquicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus III.

Figura 2. Esquema do tanque com as armadilhas de eclosão posicionadas no sedimento. A- Garrafa de polietileno de 100 mL. B- Registro para ser fechado antes da retirada das amostras da garrafa para evitar a entrada organismos da coluna de água na armadilha. C- Mangueira de conexão entre o tubo e a garrafa. D- Tubo transparente com 10 centímetros de sua extremidade enterrado no sedimento.

Figura 3. Croquis do tanque com as armadilhas posicionadas no fundo sobre o sedimento. **A:** boia auxiliar para localização da armadilha. **B:** corda para suspensão e retirada da armadilha do tanque. **C:** 4 cilindros de PVC (dimensões 30m x 10 cm de diâmetro) como parte da armadilha de sedimentação para interceptação dos ovos produzidos diariamente durante o experimento.

Figura 4. Ilustração gráfica da taxa diária de eclosão de *M. micrura* expressa em Ind.m⁻².Dia⁻¹.

Figura 5. Ilustração gráfica da taxa diária de produção da efípios de *M. micrura* do tanque estudado.

Figura 6. (A) Efípio inteiro, (B e C) Detalhes da morfologia externa do efípio.

Tabela 1. Tabela com todos os resultados encontrados relacionados aos efípios do sedimento.

LISTA FIGURAS CAPÍTULO II

Figura 1. Desenho experimental do experimento com diferentes concentrações de alimento.

Figura 2. Desenho experimental do experimento com diferentes densidades de *M. micrura*.

Figura 3. Ilustração gráfica da produção de efípios por *M. micrura*.

Figura 4. Ilustração gráfica do crescimento populacional de *M. micrura*.

Figura 5. Ilustração gráfica da produção de efípios por *M. micrura*.

Figura 6. Ilustração gráfica do crescimento populacional de *M. micrura*.

Introdução Geral

A pesca e a aquicultura são fontes importantes para subsistência e renda que provêm o alimento e nutrição para milhões de pessoas no mundo (FAO, 2016). Entretanto, a produção mundial do pescado vem decrescendo desde 1995, fato atribuído à pesca predatória e à poluição dos mares e rios (Kubitza, 2007). Essa situação impulsionou o avanço da aquicultura que hoje fornece a metade dos peixes consumidos pela população mundial (FAO, 2016). Atualmente, o Brasil ocupa o 14º lugar na produção aquícola mundial. O estado do Paraná lidera o ranking nacional, seguido de São Paulo e Rondônia. Entre as espécies mais criadas no país são a tilápia (*Oreochromis niloticus*) 58,4% e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) 18,2% (IBGE, 2016; FAO, 2016).

Na Amazônia, a pesca é basicamente artesanal, condicionada, portanto, pelo regime fluvial dos grandes rios, com superprodução na época da seca, e escassez durante a época da cheia, o que influi decisivamente no preço final do produto (Santos *et al.*, 2006). A piscicultura é uma alternativa para minimizar o efeito dessa sazonalidade. O Estado do Amazonas possui condições climáticas, biológicas e uma enorme quantidade de recursos hídricos, favorecendo o desenvolvimento da piscicultura (Lima, 2010). De acordo com o IBGE (2016), o Amazonas produziu cerca de 21 mil toneladas de peixes oriundos da piscicultura, entre as espécies mais criadas estão o tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon amazonicus*) e o pirarucu (*Arapaima gigas*). Este último com grande potencial econômico, pois pode atingir até 10 kg em seu primeiro ano de criação e sua carne é muito apreciada no mercado, devido ao seu sabor e ausência de espinhas no filé (Mattos *et al.*, 2016).

Porém, a criação de pirarucu apresenta muitos desafios na etapa de larvicultura, onde a taxa de sobrevivência é muito baixa devido à falta de alimento adequado, prejudicando a cadeia produtiva devido à baixa disponibilidade e alto custo dos alevinos. Durante os primeiros dias de vida, as larvas não consomem ração de forma voluntária, alimentam-se apenas de pequenos invertebrados como, rotíferos, cladóceros e copépodos (Conceição *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2017). Esses organismos possuem substâncias que são essenciais para o crescimento e a sobrevivência das

larvas de peixes, tais como proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos graxos e lipídeos (Watanabe et al., 1983; Rottmann et al., 2017).

Vários estudos (Cavero et al., 2003; Lima et al., 2017; Gonçalves et al., 2019) de transição alimentar foram realizados utilizando alimento vivo (zooplâncton) para gradualmente passar do alimento vivo para ração na fase larval. Os autores concluíram que o alimento vivo como dieta inicial é eficaz para aumentar a taxa de sobrevivência das larvas.

Desta forma, a obtenção de organismos planctônicos em abundância e de boa qualidade nutricional é um requisito básico para qualquer projeto de piscicultura e, que pode ser resolvido com o cultivo em instalações especiais, designadas para esse propósito ou até no próprio viveiro de piscicultura, que deve ser adaptado para este fim, onde podem ser fertilizados com adubos químicos ou orgânicos, para propiciar o desenvolvimento de microalgas e assim suportar o crescimento do zooplâncton (Sipaúba-Tavares & Rocha 2003; Rottmann et al., 2017).

Entretanto, essa técnica apresenta problemas, como por exemplo, a limitação de luz, diminuição do oxigênio dissolvido, produção de substâncias tóxicas e inibição do crescimento de outros organismos. Isto ocorre após um florescimento inicial do fitoplâncton quando há uma alta biomassa. A alta densidade do fitoplâncton ocasiona um declínio da penetração de luz nas camadas inferiores do ambiente. A decomposição dessa biomassa diminui a concentração do oxigênio, inibe o crescimento de outros organismos e provê a produção de substâncias tóxicas (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares *et al.*, 2010).

Segundo Santeiro & Pinto-Coelho (2000), Sipaúba-Tavares & Rocha (2003) e Rottmann et al (2017), para obter plâncton de ótima qualidade e em abundância, algumas medidas devem ser tomadas, como monitoramento intensivo das características físicas e químicas da água, densidade populacional e, da qualidade e quantidade do alimento que será ofertado no sistema de cultivo. O conhecimento do ciclo de vida, composição bioquímica e qualidade nutricional de diferentes espécies de fitoplâncton e de zooplâncton são de suma importância, pois, este tipo de estudo provê informações sobre a utilização final desses organismos (Macedo & Pinto-Coelho, 2000; Sipaúba-Tavares et al., 2011).

As algas nanoplanctônicas, principalmente as Chlorophyceae são conhecidas como um bom alimento vivo para organismos zooplanctônicos pois, possuem

tamanhos e formas adequadas, parede celular fina, facilitando o processo de digestão, fácil manejo e alto valor nutricional (Hardy & Castro, 2000; Safi et al., 2014).

Dentre os organismos zooplanctônicos, os microcústáceos cladóceros têm sido bastante utilizados como alimento vivo para larvas de peixes (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1994; Rottmann et al., 2017). Isso porque são consideradas presas fáceis, devido, à sua forma, pigmentação e o diâmetro do olho e, alto valor nutricional (Lazzaro, 1987). Além de possuírem rápida reprodução e curto ciclo de vida, o que permite produzi-los em grande quantidade em um curto período de tempo, tornando seu cultivo viável do ponto de vista econômico (Watanabe et al., 1983; Rottmann et al., 2017).

As taxas de crescimento, reprodução, mortalidade e qualidade nutricional dos cladóceros são influenciadas por alterações bióticas (competição, disponibilidade e qualidade de alimento) e abióticas (variáveis físicas e químicas da água e fatores climáticos) (Serafim-Júnior *et al.*, 2003; Travaini-Lima et al., 2016).

Diversos estudos (Sipaúba-Tavares et al., 1994; Santeiro & Pinto-Coelho, 2000; Lourero et al., 2011; Travaini-Lima et al., 2016), apontam que a baixa qualidade da água, disponibilidade e qualidade de alimento no ambiente são os principais fatores que influenciam negativamente o cultivo do zooplâncton. A baixa concentração de alimento no ambiente reduz o número de progênes produzidas, que em condições favoráveis variam de 4 a 40 indivíduos (Rottmann et al., 2017). Sabe-se também que a escassez e baixa qualidade do alimento podem alterar o ciclo reprodutivo dos cladóceros (Alekseev & Lampert, 2004; Brandão & Maia-Barbosa, 2014; Conde-Porcuna *et al.*, 2014). Grande parte dos Cladocera se reproduz por partenogênese cíclica, cuja fase assexuada prevalece, ocorrendo esporadicamente à fase sexuada. Durante a fase assexuada, fêmeas partenogenéticas (2n) deixam de produzir somente clones e passam a produzir fêmeas (2n) e machos (2n). Os óvulos produzidos pelas fêmeas darão origem a no máximo dois ovos de resistência no instante que forem fecundados através da cópula (Nogrady *et al.*, 1993).

Essas formas dormentes não eclodem prontamente após serem produzidos (Carvalho & Wolf, 1989), o que não é desejável em um sistema de cultivo, que precisa de grandes quantidades de organismos vivos e prontos para consumo. Após serem produzidos, as formas dormentes são liberadas na coluna d'água, muitos afundam e depositam-se no sedimento formando um banco de ovos, que são capazes de

resistirem a condições extremas (dessecação, baixas concentrações de oxigênio, extremas temperaturas e alta salinidade) podendo permanecer viáveis por décadas ou até mesmo, séculos (Sars, 1901; Hairston et al., 2000; Gyllstrom & Hanson, 2004; Eskinazi-San'Anna & Pace, 2018).

A produção das formas dormentes em tanques de cultivo, por outro lado, é importante para a formação do banco de ovos e se constituirão na reserva de “sementes” para futuros cultivos. O banco de ovos funciona como um reservatório de espécies presentes naquele ambiente (Hairston, 1996; Hairston & Cáceres, 1998; Brendonck e De Meester, 2003), assim garante que parte da população sobreviva, caso os organismos presentes na coluna d'água morram (Carvalho e Wolf, 1989; Gyllstrom & Hanson, 2004). As formas dormentes que são produzidas serviram também para se iniciar um cultivo, exemplo de grande sucesso são as formas dormentes de *Artemia* sp. (Dhont & Van Stappen, 2003).

Entretanto, a produção dessas formas dormentes no momento em que esses organismos serão disponibilizados para as larvas, ao serem ingeridos, podem causar grande mortalidade nessa fase da vida dos peixes. Segundo Brendonck & De Meester (2003) em algumas espécies, os embriões são envoltos por uma membrana quitinosa que é capaz de passar pelo trato digestório dos peixes sem ser danificado. Foi observada mortalidade de larvas de pirarucu (*Arapaima gigas*) ao se alimentarem de cladóceros carregando essas formas dormentes, pois, estas passam intactos pelo trato digestório da larva, acumulando-se no estômago ou reto, e, causando prolapso retal e conseqüentemente a morte da larva (Com. Pessoal., Gonçalves dados não publicados).

Portanto, é primordial para o sucesso da larvicultura de organismos que dependem do alimento vivo, entender em quais condições o zooplâncton passa a produzir as formas dormentes, além de compreender o papel dessas formas para a produção do zooplâncton como alimento vivo.

Objetivos

Objetivo Geral:

Compreender o papel das formas para a produção do zooplâncton como alimento vivo e em quais condições passam a produzir as formas dormentes.

Objetivos específicos:

- Estimar a densidade de ovos de resistência de *M. micrura* presentes no sedimento do tanque;
- Estimar a taxa de eclosão de ovos de resistência de *M. micrura* nos tanques externos;
- Estimar a produção de ovos de resistência e *M. micrura* nos tanques externos;
- Reconhecer e identificar os ovos de resistência de *M. micrura* por meio de características morfológicas;
- Verificar, em laboratório, se a disponibilidade de alimento está relacionada com a produção de ovos de resistência de *M. micrura*;
- Verificar, em laboratório, se a densidade populacional está relacionada com a produção de ovos de resistência de *M. micrura*;

Organização da dissertação

Esta dissertação está dividida em dois capítulos, que se encontram no formato de artigo científico, ambos seguindo a norma do periódico *Acta Amazônica*.

O primeiro capítulo aborda o papel das formas dormentes no cultivo do zooplâncton, a partir experimentos de eclosão e produção das formas dormentes in situ. Com os resultados encontrados, ficou claro a importância do papel das formas dormentes para o cultivo do zooplâncton.

O segundo capítulo testou por meio de experimentos em laboratório se a concentração do alimento e o aumento na densidade populacional estão relacionadas com a produção de formas dormentes durante o período de cultivo do zooplâncton. Com os resultados obtidos ficou claro que a densidade de algas no meio de cultura é fundamental para que a reprodução assexuada prevaleça na população e conseqüentemente um maior número de organismos.

Referências

- Conde-Porcuna, J. M. Ramos-Rodríguez, E. Pérez-Martínez, C. 2014. In situ production of empty ephippia and resting eggs by an obligate parthenogenetic *Daphnia* population. *Journal of Plankton Research*, 36(1): 157-169.
- Alekseev, V; Lampert, W. 2004. Maternal effects of photoperiod and food level on life history characteristics of the cladoceran *Daphnia pulicaria* Forbes. *Hydrobiologia*, 526: 225–230.
- Brandão, L. P. M; Pujoni, D. G. F; Maia-Barbosa, P. M. 2014. Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge, 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for *in situ* evaluation. *Brazilian Journal of Biology*, 74 (3): 642-648.
- Brendonck, L. & De Meester, L. 2003. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 49: 65–84.
- Cáceres, C. E. 1998. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, 79 (5): 1699-1710.
- Carvalho, G. R; Wolf, H. G. 1989. Resting eggs of lake-*Daphnia*. I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshwater Biology*, 22: 459–470.
- Cavero, B.A.S.; Ituassu, D.R.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Bordinhon, A.M.; Fonseca, F.A.L.; Ono, E.A. 2003. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, p. 1011-1015.
- Conceição, L.E.C.; Yúfera, M., Makridis, P.; Morais, S. Dinis, M. T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41, 613-640. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x.
- Dhont, J. & Van Stappen, G. 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia*. In: Josianne G. S. Støttrup & Lesley, A. Mc Evoy. (Eds) *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science Publications. Oxford, Inglaterra.
- Eskinazi-Sant'Anna, E. M. & Pace, M.L. 2018. The potential the zooplankton resting-stage bank to restore communities in permanent and temporary waterbodies. *Journal the Plankton research*, 40(4): 458-470.
- FAO. 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.

- Gonçalves, L.U.; França, L.A.; Epifânio, C.M, et al. 2019. Ostracoda impairs growth and survival of *Arapaima gigas* larvae. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.012>.
- Gyllstrom, M.; Hanson, A. L. 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66: 274-295.
- Hardy, E.R.; Castro, J.G. 2000. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. *Acta Amazonica*, 30: 39-47.
- Hairston, N.G. Caceres, C. E. 1996. Distribution of crustacean diapause: Micro- and macroevolutionary pattern and process. *Hydrobiologia*. 320: 27-44.
- Hairston, N.G. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography*, 41(5): 1087-1092.
- Hairston, N.G., Hansen, A.M. & Schffner, W.R. 2000. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage. *Freshwater Biology*, 45: 133-145.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2016. *Produção da pecuária municipal*, IBGE, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Kubtiza, F. 2007. "O mar está prá peixe... ..Prá peixe cultivado". *Panorama da Aquicultura*, 17 (100): 14-23.
- Lazzaro, X. 1987. A review of planktivorous fishes, their evolution, feeding behaviors, selectives, and impacts. *Hydrobiologia*, 146: 97-167.
- Lima, A. G. 2010. O mercado do pescado da região metropolitana de Manaus. CFC/FAO/INFOPECA. Montivideo, Uruguay. 84 p.
- Lima, A.F.; Rpdrigues, A.P.O.; Lima, L.K.F.; Maciel, P.O.; Rezende, F.P.; Freitas, L.E.L.; Tavares-Dias, M.; Bezerra, T.A. 2017. Alevinagem, recria e engorda de pirarucu. Primeira edição, Embrapa, Brasília, Distrito Federal.
- Loureiro, B. R.; Costa, S.M.; Macedo, C. F.; huszar, V. L. M.; Branco, C.W.C. 2011. Comunidade zooplanctonica em sistemas de criação de peixes. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(1): 47-60.
- Macedo, C. F.; Pinto-Coelho, R. M. 2000. Efeito das algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricuada* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*. *Acta Scientiarum*, 22(2): 397-401.

- Mattos B. O., Nascimento Filho E.C.T., Barreto K.A., Braga L.G.T. and Forte-Silva R. 2016. Self-feeder systems and infrared sensors to evaluate the daily feeding and locomotor rhythms of pirarucu (*Arapaima gigas*) cultivated in outdoor tanks. *Aquaculture*. 457, 118-123. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.026.
- Nogrady, T., R. L.; Wallace. Nell, T. W. S. 1. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world: Volume 4: Rotifera. *SPB Academic Publishing*, New York. 1993.
- Pérez-Martínez, C.; Jiménez, L.; Moreno, E; Conde-Porcuna, J. M. 2013. Emergence pattern and hatching cues of *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera) in an alpine lake. *Hydrobiologia*, 707: 47-57.
- Pinto-Coelho, R.M; Sá Junior, W.P. & Corgosinho, P.H. 1997a. Variação nictemeral do status nutricional do zooplâncton em tanques de cultivo de plâncton. *Rev. Unimar* 19(2): 521-535.
- Rottmann R.W., Graves S.J., Watson C., Roy P. and Yanong E. (2017). Culture techniques of *Moina*: The ideal *Daphnia* for feeding freshwater fish fry. CIR 1054, FAO, Rome: 2-9.
- Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, PY.; Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265-278.
- Santeiro, R.M; Pinto-Coelho, R.M. 2000. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado para alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG. *Acta Scientiarum* 22(3):707-716.
- Santos, G. M; Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S. 2006. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea. Pp 144.
- Sars, G.O. Contributions to the knowledge of the Fresh-water Entomostraca of South America. *Archiv for Mathematic Naturvidenskab* XXIII. Nº 3. 1901.
- Sipaúba-Tavares, L. H; Rocha, O. 1993. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. *Biotemas*, 6 (1): 93-106.
- Sipaúba-Tavares, L. H; Rocha, O. 1994. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II – Organismos Zooplanônicos. *Biotemas*, 7 (1 e 2): 94-109

- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos 2 ed. São Carlos: RiMa . 122p.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Lourenço, E. M.; Braga, F. M. S. 2010 Water quality in six sequentially disposed fishponds with continuous water flow. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(1):9-15.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Donadon, A. R. V. & Milan, R. N. 2011. Water quality and plankton population in an earthen polyculture pond. Brazil. *Braz. J. Biol.*, 71(4): 845-85.
- Serafim-Júnior, M.; Lansac-Tôha, F.A.; Paggi, J.C.; Velho, L.F.M. & Robertson, B.A. 2003. Cladocera fauna composition in a river-lagoon system of the upper Paraná river floodplain, with a new record for Brazil. *Brazil Journal Biology*, 63(22): 349-356.
- Soares, C.M.; Hayashi, C.; Gonçalves, G. S.; Galdioli, E. M. & Boscolo, W. R. 2000. Plâncton, *Artemia* sp, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. *Acta Scientiarum*, 22(2): 383-388.
- Travaini-Lima, F.; Milstein, A.; Sipaúba-Tavares, L.H. 2016. Seasonal differences in plankton community and removal efficiency of nutrientes in organic matter in subtropical constructed wetland. *Wetlands*, 36: 921-933.
- Watanabe, T.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.

Capítulo I

FORMAS DE RESISTÊNCIA DE CLADÓCEROS: IMPLICAÇÕES PARA AQUICULTURA

Formas de resistência de cladóceros: implicações para aquicultura

Renan Gomes do NASCIMENTO^{1*} Edinaldo Nelson dos SANTOS-SILVA¹

¹Laboratório de Plâncton - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Manaus, Amazonas
Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, Amazonas – CEP 69060-001

*Autor correspondente: renaan112@gmail.com

Resumo

A produção de zooplâncton para a alimentação de larvas de peixes é uma atividade importante para o desenvolvimento da piscicultura na Amazônia. Em tanques escavados, esta produção é iniciada por inoculação e mantida posteriormente pela reprodução partenogenética e, pela eclosão das formas de resistência presentes no sedimento. Neste contexto, entender e quantificar a produção e eclosão dessas formas para a produção de *Moina micrura* como alimento vivo é objetivo deste estudo. Foi utilizado um tanque (9,6x4,8x0,9m) no INPA. No tanque, foram realizadas coletas do sedimento para estimativa da densidade de formas de resistência presentes no sedimento, taxa de eclosão e de produção. Foi estimado uma densidade de 1,18 de efípios/g de sedimento. A taxa média de eclosão foi de 20,8 indivíduos m⁻² dia⁻¹. A taxa média de produção foi de 164,5 formas de resistência m⁻² dia⁻¹. As formas de resistência presentes nos sedimentos são determinantes para o sucesso na produção do zooplâncton. A prática de retirada da camada superficial do sedimento é inadequada, pois comprometerá o processo de eclosão e produção do zooplâncton.

Palavras-chave: *Moina micrura*, efípio, produção de zooplâncton

Resting eggs of cladocerans: implications for aquaculture

Abstract

The zooplankton production for fish larvae feed is an important activity for the Amazonia's fish farming development. In hollow tanks, this production is initiated by inoculation and settled latter with parthenogenetic reproduction and by the hatching of resting eggs from the sediment. That way, understanding and quantifying the hatching and production of this resting eggs to produce *Moina micrura* as live feeds is the purpose of this study. A tank (9.6x4.8x0.9m) at INPA was used. In the tank, sediment sampling for both density estimation and daily hatching of resting eggs, as well as the collection of resting eggs produced by the active community in the tank. The estimated density was 1.18 effipios/g in sediment. The mean hatching rate was 20.8 individuals m⁻² day⁻¹. The production's average rate was 164.5 resting eggs m⁻² day⁻¹. The resting eggs present in the sediments are determinant for the success in zooplankton production. The practice of superficial sediment layer removal is unappropriated, as it will compromise the process of hatching and zooplankton production.

Key-words: *Moina micrura*, ephippium, zooplankton production

Introdução

A produção de zooplâncton para a alimentação de larvas de peixes, é essencial para o desenvolvimento da piscicultura (Watanabe et al., 1983; Sipauba-Tavares, 2003; Malla & Banik, 2015). A produção de zooplâncton em grande escala normalmente é feita em tanques escavados (50-200m³), que inicialmente são drenados e após um período de quatro dias, são reabastecidos e fertilizados com esterco de porco e aves ou fertilizantes industriais, tais como, ureia e super fosfato triplo e cloreto de potássio. Após esse procedimento, o fitoplâncton é inoculado e, após a floração entre 4-5 dias, o zooplâncton é inoculado, com uma densidade variando de 40 a 60 org/L, onde as primeiras colheitas podem ser realizadas a partir do 7º dia, na qual os organismos atingem suas maiores densidades, variando de 15.000 a 20.000 org/L (Sipauba-Tavares, 2003; Rottmann et al., 2017).

Depois do processo inicial de inoculação, o fitoplâncton pode ser mantido no ambiente realizando novamente a fertilização e se as condições forem adequadas, o zooplâncton poderá se manter no tanque pela reprodução assexuada ou poderá se manter pelas eclosões das formas dormentes presentes no sedimento, esta última é de grande importância, entretanto, o seu papel na produção de zooplâncton nunca foi abordado. Esses ambientes são frequentemente manipulados, com adição de fertilizantes, drenagem, raspagem superficial do sedimento e introdução de organismos, apresentando mudanças constantes nas condições abióticas e bióticas, tais como, temperatura, pH, penetração de luz e concentração do alimento (Bosma & Verdegem, 2011), que irá influenciar diretamente no crescimento, reprodução, mortalidade e qualidade nutricional do zooplâncton (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1994; Santeiro & Pinto-Coelho, 2000). Dentre alguns fatores abióticos e bióticos citados acima, tais como; luz, temperatura e disponibilidade de alimento, já são conhecidas como responsáveis por, induzir a produção e eclosão das formas dormentes em cladóceros (Stross, 1971; Hairston et al., 2000; Conde-Porcuna et al., 2013; Dinh et al., 2018), um organismo frequentemente utilizado como alimento vivo na piscicultura (Watanabe et al., 1983; Malla & Banik, 2015).

As formas dormentes são adaptações para que parte da população sobreviva em condições ambientais adversas (Hairston et al., 2000; Eskinazi-Sant'Anna & Pace, 2018). Boa parte dessa produção deposita-se no sedimento (Brendonck & De Meester, 2003), onde são encontrados em grandes quantidades, variando de 0,2 – 40

x 10⁶ ovos e/ou efípios por m² (Gyllstrom & Hansson, 2004), formando o banco de ovos ou comunidade dormente, que eclodem periodicamente ou continuamente, variando de 7 – 106 indivíduos por m⁻² dia⁻¹(Gyllstrom & Hansson, 2004), se adequadamente estimulados (Carvalho e Wolf, 1989), desempenhando um papel fundamental no processo de recolonização, permitindo o rápido reestabelecimento no ambiente após um período desfavorável, influenciando temporal e espacialmente a dinâmica populacional desses organismos (De Stasio, 1999; Brandão et al., 2014).

Apesar de já existirem alguns trabalhos quantificando a produção, eclosão e densidade dessas formas dormentes no sedimento para ambientes naturais (Hairston et al., 2000; Pérez-Martínez, 2014; Brandão et al., 2014), não existem essas informações para tanques utilizados para a produção de zooplâncton. Levando em consideração que o maior problema causador da alta taxa de mortalidade das larvas de peixes, é a falta de alimento vivo disponível em grandes quantidades, essas informações são básicas e fundamentais para a produção planejada de zooplâncton em tanques escavados. Neste contexto, entender e quantificar a produção e eclosão dessas formas dormentes para a produção de zooplâncton é o objetivo deste estudo.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde os experimentos *in situ* foram realizados na Estação de Aquicultura do INPA, Campus III e as atividades de laboratório ocorreram no Laboratório de Plâncton, INPA, Campus II. Para os experimentos *in situ* as observações foram realizadas em um tanque de alvenaria (9,6x4,8x0,9m), com fundo recoberto com camada de sedimento (10cm) composta de argila e areia (**Figura 1**).

Espécie alvo

Para a realização do estudo, escolhemos *Moina micrura* Kurtz, 1874 (Crustacea: Anomopoda), um organismo bastante utilizado como alimento vivo devido as características favoráveis, como, rápida reprodução, ciclo de vida curto, boa qualidade nutricional e frequentemente encontrado em tanques de piscicultura (Malla & Banik, 2015).



Figura 1. Tanque utilizado no estudo (9,6x4,8x0,9m). Localizado na Estação de Aquicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus III.

Método geral de obtenção dos dados

No tanque, foram realizadas coletas do sedimento tanto para a estimativa da densidade das formas de resistência quanto para estimar a taxa de eclosão diária, além disso foram realizadas coletas das formas dormentes produzidas pela própria comunidade ativa do tanque.

Para a verificação da taxa de produção e eclosão de efípios *in situ*, foi realizada ao início de cada um deles, a drenagem do tanque e adotado procedimento de correção do pH através da adição de calcário agrícola (100g/m²) diretamente no fundo do tanque seco. Após o período de três dias o tanque foi novamente cheio e fertilizados com Ureia, Super fosfato triplo e Cloreto de potássio, com a respectiva formulação 20:5:20, conforme protocolo proposto por Sipaúba-Tavares & Rocha (2003). Ambas amostragens para verificação das atividades de, eclosão e produção das formas de resistência de cladóceros foram realizados separadamente no período de 30 dias cada.

1-Estimativa da densidade de efípios no sedimento

Para estimar a densidade de ovos no sedimento do tanque foi coletado 10 testemunhos enquanto o tanque esteve seco. Cada testemunho compreendeu uma porção do sedimento de fundo do tanque, amostrado através de tubo PVC de 50 mm de diâmetro. Foi utilizada a camada correspondente aos 3 centímetros superficiais do testemunho coletado (Brendonck & De Meester, 2003). O material foi acondicionado em sacos plásticos e encaminhado ao laboratório e conservado sob refrigeração (8°C) até o momento do processo de triagem. Para separar as formas de resistência do sedimento foi utilizado o método proposto por Onbé (1978) onde: 120 gramas de sedimento foram colocadas em um becker de 250 ml contendo uma solução de água destilada e sucrose (1:1) para homogeneização. Essa solução foi centrifugada a 2700 rpm durante 3 minutos. O material sobrenadante foi filtrado em uma rede de 50 µm e o retido submetido à quantificação sob estereomicroscópio. A densidade foi calculada através da fórmula $Densidade = N^{\circ} \text{ efípios/gramas de sedimento}$ e o resultado expresso em *efípios/g*.

Em laboratório, após a separação dos efípios do sedimento, 86 efípios foram selecionados e colocados em cubas de plásticos de 25mL com água destilada e colocados em incubadora (Modelo EL202), com intensidade de luz (2780 lux), fotoperíodo (12 horas/12 horas) e temperatura (30°C) controlados. Os efípios foram observados duas vezes ao dia (manhã e final da tarde) durante 30 dias.

2-Estimativa da taxa de eclosão dos efípios do sedimento do tanque

Para estimar a taxa de eclosão diária dos ovos de resistência do sedimento foram construídas armadilhas com base nos equipamentos utilizados por De Stasio (1989), Cáceres (1998), Hairston et al. (2000), Pérez-Martínez et al. (2014) e Bandeira (2016). Cada armadilha é composta por um tubo transparente de 20 cm de diâmetro com dois furos de 4 cm de diâmetro cobertos por rede de 20 µm de abertura para recirculação da água do ambiente, a parte superior do tubo possui formato afunilado que convergiu para um furo central ligado a uma mangueira transparente de 80 cm de comprimento, com um frasco claro de polietileno de 200ml e funil acoplados em sua extremidade superior garantindo a retenção das neonatas (**Figura 2**). Foram fixadas 10 armadilhas de eclosão no fundo do tanque antes que fosse cheio, estratégia adotada para o isolamento completo de parte da camada do sedimento e das formas

de resistência presentes no sedimento. As armadilhas permanecendo por 30 dias a partir do enchimento do tanque e analisadas diariamente. Os organismos capturados nas armadilhas de eclosão foram acondicionados e fixados com etanol 96%.

Em laboratório os organismos eclodidos foram identificados e quantificados com auxílio de estereomicroscópio Wild M3C e microscópio óptico binocular Zeiss, lentes 1x-40x e através das consultas às literaturas especializadas de Elmoor-Loureiro (1997) e demais especialistas do laboratório de Plâncton do INPA.

Para a taxa média de eclosão diária foi calculado seguindo a fórmula *área da superfície da armadilha/Indivíduos eclodidos* e os resultado expresso em $Y m^{-2} dia^{-1}$, onde Y é o número de indivíduos eclodidos.



Figura 2: Esquema do tanque com as armadilhas de eclosão posicionadas no sedimento. A- Garrafa de polietileno de 100 mL. B- Registro para ser fechado antes da retirada das amostras da garrafa para evitar a entrada organismos da coluna de água na armadilha. C- Mangueira de conexão entre o tubo e a garrafa. D- Tubo transparente com 10 centímetros de sua extremidade enterrado no sedimento.

3 - Estimativa da taxa de produção de efípios dos cladóceros do tanque

Para estimar a taxa da produção diária dos efípios foram utilizadas oito câmaras de sedimentação. Cada câmara é composta por quatro subcâmaras de tubo PVC 30 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro. Todas foram colocadas no fundo do tanque para interceptação dos efípios produzidos pelos organismos (**Figura 3**).

Cada câmara foi retirada do fundo do tanque diariamente para a observação dos dados. O material retido dentro das subcâmaras foram filtrados através de rede de plâncton de 55 μ m. As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno de 100 ml e algumas foram fixadas com etanol 96%. A taxa média de produção diária de

efípios foi calculada seguindo a formula $\text{área da armadilha}/\text{Efípios produzidos}$ e expresso em $\text{Efípios } m^{-2} d^{-1}$.

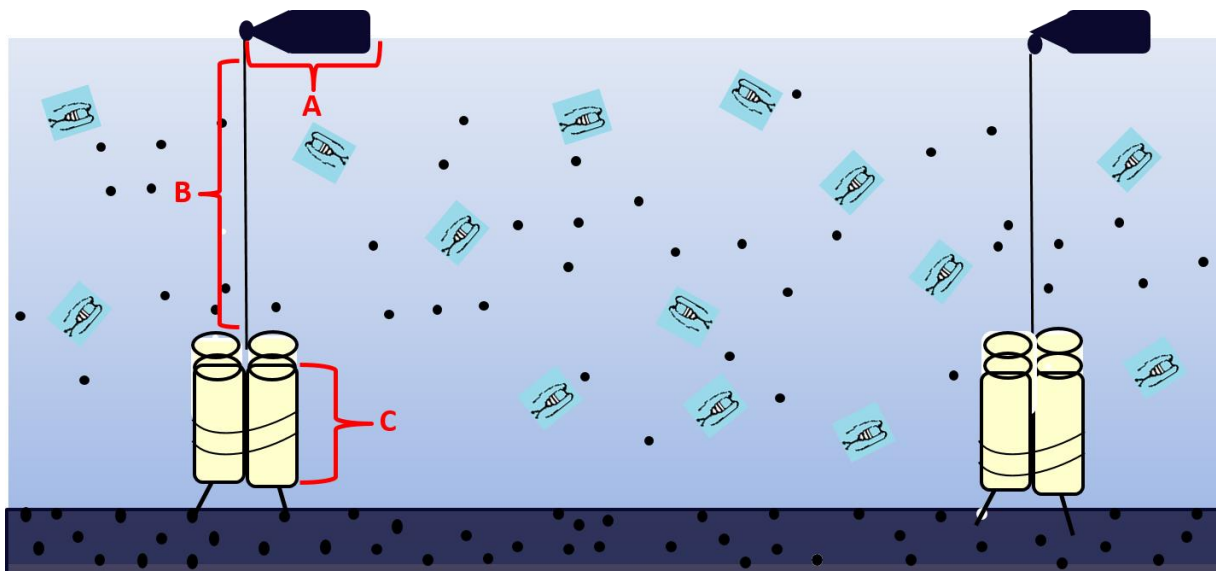


Figura 3. Croquis do tanque com as armadilhas posicionadas no fundo sobre o sedimento. **A:** boia auxiliar para localização da armadilha. **B:** corda para suspensão e retirada da armadilha do tanque. **C:** 4 cilindros de PVC (dimensões 30cm x 10 cm de diâmetro) como parte da armadilha de sedimentação para interceptação dos ovos produzidos diariamente durante o experimento.

Concomitantemente às observações diárias nas sub-câmaras foram coletadas água do tanque para quantificação da densidade das algas e do zooplâncton presente no ambiente. Para coleta das algas foi utilizado um tubo PVC de 1,5 de comprimento e 60mm de diâmetro acoplado com uma válvula de retenção para retenção da água em uma das extremidades. A água retida no tubo foi acondicionada em um balde, homogeneizada e sub-amostrada em 250ml posteriormente fixados com lugol acético. A contagem foi feita utilizando método Câmara de Neubauer (Karlson et al., 2010) seguindo a formula:

$$\text{Densidade} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas}}{8 \times 10 \times 10^{-4}}$$

Onde: 8 é o número de quadrados grandes contados e 10×10^{-4} = o volume da amostra nos quadrados grandes com uma área equivalente a $0,0018 \text{ mm}^3$ e o valor final expressa em células por ml^{-1} .

Para estimar a densidade de zooplâncton foram feitas coletas da coluna d'água (0,9m) utilizando uma rede de plâncton com abertura de malha de $65 \mu\text{m}$ e 30cm de

diâmetro, armazenando o material coletado em pote de polietileno de 100mL e fixados com etanol 96%. Em laboratório um balão volumétrico de 250 ml foi utilizado para acondicionar o material. O material coletado foi homogeneizado e uma alíquota de 2,5 ml foi retirada com pipeta Stempel. A alíquota foi colocada em placa de Petri milimétrica e a quantificação dos organismos realizada sob estereomicroscópio Wild M3C (4x-40x).

Análise da morfológica externa do efípio

Os efípios de *M. micrura* foram coletados através de amostras do sedimento de um tanque de piscicultura com o auxílio de um core e foram separadas do sedimento utilizando o método proposto por Onbé (1978). Os efípios encontrados foram lavados em água destilada, desidratados em série de acetona e secos usando-se a técnica de ponto crítico. Em seguida os efípios foram montados em bases metálicas “stubs” e metalizados com ouro. Posteriormente as imagens foram feitas com um microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 435VP.

Resultados

Densidade de ovos do sedimento do tanque

Foi estimado uma densidade de 1,18 de efípios/g de sedimento, os efípios aparentemente viáveis que foram incubados, apenas 37 eclodiram durante a incubação. As primeiras eclosões foram observadas após o segundo dia de experimento e continuaram até o 10^o dia, após esse período, não ocorreram eclosões, *M. micrura* foi a única espécie eclodida (tabela 1).

Tabela 1. Tabela com todos os resultados encontrados relacionados aos efípios do sedimento.

Resultados dos efípios do sedimento do tanque	
Total de efípios	1426
Efípios vazios	743
Efípios viáveis	86
Eclodidos	37

Taxa de eclosão diária dos ovos de resistência do sedimento

Houve eclosão somente de *Moina micrura*. As primeiras eclosões começaram a partir do terceiro dia de experimento, com o maior número de eclosões nas duas primeiras semanas de experimento, com uma média de 20,8 indivíduos $m^{-2} dia^{-1}$ (Figura 4).

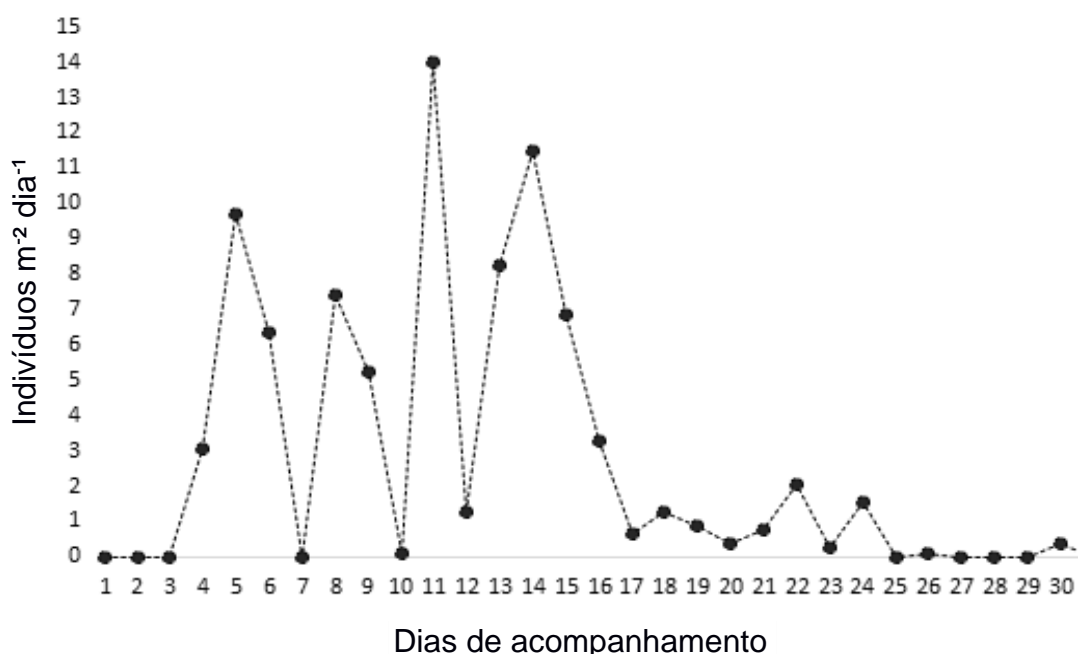


Figura 4. Ilustração gráfica da taxa diária de eclosão de *M. micrura* expressa em $Ind.m^{-2}.Dia^{-1}$.

Taxa de produção diária de ovos de resistência e densidade de *M. micrura* e algas

A presença de *M. micrura* na coluna d'água começou a ser observada a partir do quinto dia de experimento. A densidade variou de 0 a 1.903 $org.m^{-3}$ durante o experimento. Os efípios só foram detectados após o quinto dia de coleta, apenas efípios de *M. micrura* foram encontradas. A produção foi contínua, variando de 0 a 2.629 efípios $m^{-2} dia^{-1}$ (Figura 5).

As observações referentes as algas indicaram presença somente a partir do quinto dia de experimento. A densidade de espécies registradas esteve distribuída em três gêneros, sendo *Chlorella*, *Ankistrodesmus* e *Desmodesmus*. A densidade variou de 13×10^3 células/ml a 7×10^6 células/ml durante o experimento.

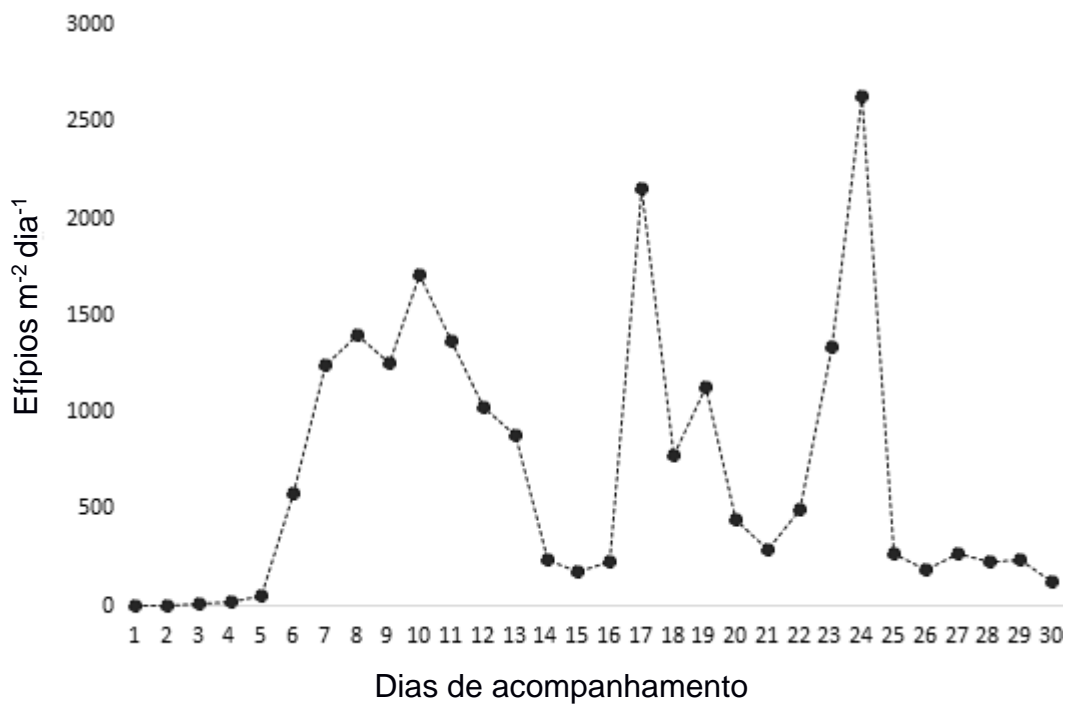


Figura 5. Ilustração gráfica da taxa diária de produção da efípios de *M. micrura* do tanque estudado.

Morfologia externa do efípio

O efípio de *M. micrura* tem cerca de $0,678 \mu\text{m}$ de comprimento, $0,435 \mu\text{m}$ de largura. Bivalve, unilocular, superfície da carapaça com polígonos irregulares, com a presença de uma protuberância oval (Figura 7A, 7B e 7C).

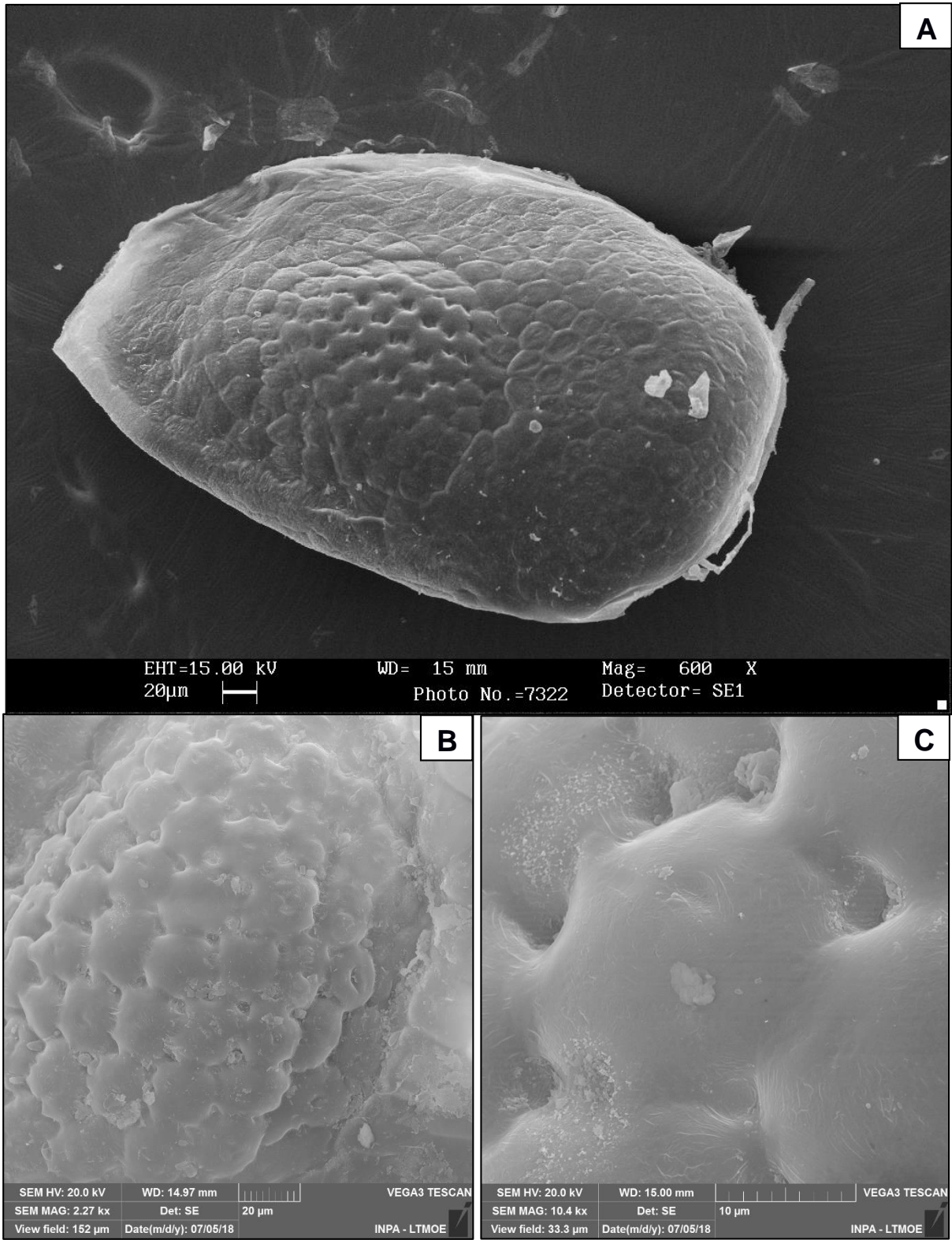


Figura 6. (A) Efépio inteiro, (B e C) Detalhes da morfologia externa do efépio.

Discussão

Densidade de efípios no sedimento do tanque

A densidade do banco de ovos ou comunidade dormente depende de uma combinação de fatores, tais como, a produção pela comunidade ativa, que pode ser contínua ou periódica (Ricci, 2001), eclosões e mortalidade (infecção, predação e senescência) (De Stasio, 1989; 1990; Gyllstrom & Hansson, 2004).

No presente estudo, o número de formas dormentes encontradas no banco de ovos do tanque é semelhante aos registrado para ambientes naturais (Hairston, 1996; Conde-Porcuna et al., 2014), este tipo de informação é inexistente para tanques. A presença do banco de ovos do tanque estudado era esperada, levando em consideração o tempo que existência do mesmo (39 anos), outro fator é o manejo que é submetido, como a adição de nutrientes, que causam modificações na densidade e composição do fitoplâncton, principal alimento dos cladóceros, a densidade do fitoplâncton têm sido relatada como um dos principais fatores que desencadeiam o processo de produção de formas dormentes nesses organismos (Alekseev & Lampert, 2004; Conde-Porcuna et al., 2014).

A predominância de efípios de *M. micrura* pode ser explicada devido a espécie ser o único representante de cladóceros observado na comunidade ativa do tanque durante o estudo. Essa espécie tem sido comumente encontrada nesses ambientes (tanques, lagos) (Loureiro et al., 2011; Bosma et al., 2011), parecendo refletir uma habilidade de adaptação e maior tolerância sobre essas condições. Além disso, *M. micrura* tem sido uma espécie tradicionalmente utilizada como alimento vivo na piscicultura, exatamente pela frequência de ocorrência nesses ambientes e por ser resistente ao manejo (Sipaúba-Tavares et al., 2008; Azuraidi et al., 2013).

A presença do banco de ovos nos tanques de produção de zooplâncton ou até mesmo no tanque onde os peixes são criados, são de grande importância, funcionam como um “reservatório de alimento vivo”, pois, é por meio da eclosão dessas formas dormentes que os organismos recolonizam o ambiente e continuam eclodindo ao longo do período de produção, contribuindo para o incremento de biomassa para o ambiente, além de garantirem que parte da população sobreviva, caso algum incidente aconteça e a população ativa morra. Outra importância da presença das

formas dormentes, é que diminuem as chances de contaminação no ambiente, uma vez que o produtor não precisará fazer o procedimento inicial de inoculação a cada ciclo de produção, além de servirem como inoculos iniciais, como observado com os ovos que foram retirados do sedimento e expostos aos estímulos de quebra da dormência.

Taxa diária de eclosão das formas dormentes do sedimento

A taxa de eclosão encontrada no presente estudo e o dia em que começaram as eclosões são semelhantes aos outros trabalhos realizados tanto em ambientes naturais (De Stasio, 1989; Pérez-Martinez et al., 2013 e Bandeira, 2016) como em laboratório (Alekseev & Lampert, 2004; Pérez-Martinez et al., 2013; Brandão et al., 2014). Observamos um pico de eclosões nos primeiros 15 dias, nos demais dias as eclosões foram baixas ou inexistente. Luz e temperatura são relatados como os principais fatores envolvidos nesse processo para cladóceros (Stross, 1966; Brendonck & De Meester, 2003; Gyllström & Hansson, 2004), porém, esses fatores não foram mensurados durante o estudo. Pérez-Martinez et al., (2013) apontam que as formas de resistência tendem a eclodirem logo após receberem o estímulo de quebra da dormência, isso possibilitaria que o organismo tenha um maior tempo de sobrevivência em condições favoráveis. Já a redução das eclosões a partir do 20º dia de experimento, pode estar relacionado a quantidade de ovos presentes na superfície do sedimento dentro da área da armadilha, que devem ter eclodido durante os primeiros dias, período que foi registrado o pico de eclosões.

Já é bem documentado a importância dos organismos oriundos das formas dormentes na dinâmica das populações de cladóceros de água doce, onde, em alguns casos, a população depende exclusivamente da eclosão das formas dormentes presentes no banco de ovos para recolonizarem o ambiente após um período desfavorável (Hairston et al., 2000; Gabaldón et al., 2018). No presente estudo, foi possível observar esse fenômeno, uma vez que o ambiente experimental passou por um período sem água e, a água que abastece o tanque vem do lençol freático, eliminando a possibilidade de que os organismos encontrados fossem oriundos de outro lugar, sem ser do banco de ovos, afirmando ainda mais a importância da

presença das formas dormentes durante o processo inicial da produção do zooplâncton.

Produção de formas dormentes no tanque

A produção de formas dormentes é comum na maioria dos cladóceros, que são produzidas em resposta as condições adversas, na qual por meio de aparatos sensoriais, conseguem perceber alterações no ambiente, como mudança na temperatura, fotoperíodo, predação, alta densidade e disponibilidade de alimento (Gyllström & Hansson, 2004; Abrusán, et al., 2007). Essa produção pode ser contínua ou periódica, isso irá depender totalmente das características do ambiente e o grau de adaptabilidade da espécie (Cáceres, 1998; Ricci, 2001).

No presente estudo, registramos efípios somente a partir do 5º dia, a produção foi contínua durante o experimento. Dentre os fatores que normalmente são relatados como estímulos para desencadear o processo de produção das formas dormentes em cladóceros, o mais lucido para o presente estudo, parece ser a disponibilidade do alimento, pois, durante a realização do experimento, a concentração ideal (acima de 10^5 cells/mL) (Ventura et al., 1980), para que *M. micrura* possa se reproduzir somente por partenogênese, só foram registradas no intervalo entre o 6º e 10º dia de experimento, ainda sim, ocorram produção neste período. Considerando que a falta de alimento foi o principal responsável pela indução a produção das formas dormentes, os protocolos de fertilização desses ambientes devem ser revisados, as formulações das concentrações de nutrientes devem ser feitas levando em consideração quais espécies de algas estão presentes no ambiente, uma vez que cada espécie de alga responde diferentemente em relação as concentrações de nutrientes no ambiente, principalmente nitrogênio e fosforo (Pal & Choudhury, 2014; Sipaúba-Tavares et al., 2014).

Apesar da produção de zooplâncton em tanques escavados almejar a obtenção desses organismos em grande quantidade, a produção dessas formas dormentes que não eclodiram prontamente produzidas, são de grande importância no processo de produção do zooplâncton, tanto no processo inicial de recolonização do ambiente como durante o processo de produção, na qual continuaram eclodindo, renovando sempre a população.

Considerações finais

Os resultados alcançados com essa pesquisa são dados pioneiros para o conhecimento sobre as formas de dormência de cladóceros em tanques utilizados para a produção de zooplâncton. Através dos nossos resultados é possível notar a importância de agregar esse tipo de estudo com tanques aos estudos realizados sobre esses organismos em lagos naturais, sendo esses últimos boas fontes de conhecimento para ampliar a eficiência e o sucesso da produção de peixes e outros organismos aquáticos a partir da sua relação com os zooplânctons.

Contudo, o conhecimento sobre as formas de resistência de cladóceros no tanque estudado trouxe um bom avanço para os entendimentos necessários acerca da sua importância no contexto do ambiente experimentado. Estudos futuros, abrangendo maiores períodos de amostragem e, até mesmo, acompanhando a dinâmica da reprodução desses microrganismos junto com as espécies de cultivo serão úteis para que possamos conhecer melhor acerca dos elementos e fatores que determinam não apenas o sucesso da aquicultura na região, mas a complexidade de vida desses organismos em suas mais variadas formas de existência.

Conclusão

1. A presença do banco de ovos é determinante para o sucesso de reestabelecimento de *M. micrura* como fonte de alimento vivo;
2. Os 15 primeiros dias não são indicados a coleta, uma vez que neste período ocorre o maior número de eclosões, desta forma, a população tem tempo de se estabelecer no ambiente.
3. Ao fim de cada ciclo de cultivo, é necessário que o produtor induza a produção das formas de resistência, desta forma, garantindo a reposição do banco de ovos.

Referências bibliográficas

- Alekseev, V; Lampert, W. 2004. Maternal effects of photoperiod and food level on life history characteristics of the cladoceran *Daphnia pulicaria* Forbes. *Hydrobiologia*, 526: 225–230.
- Alekseev, V & Starobogatov, Y.I. 1996. Types the diapause in Crustacea: Definitions, distribution, evolution. *Hydrobiologia*, 320:15-96.
- Abrusán, G.; Fink, P.; lampert.; 2007. Biochemical limitation of resisting egg production in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 52(4): 1724-1728.
- Azuraidi, O. M; Yusoff, F. M; Raha, R. A; Alekseev, V. R; Matias-Peralta, H. M. 2013. Effect of food density on male appearance and ephippia production in a tropical cladoceran, *Moina micrura* Kurz, 1874. *Aquaculture*, 412–413: 131–135.
- Bandeira, M. G. S.; Santos-Silva, E. N. 2016. Eclosão in situ de formas dormentes de microcústáceos e rotíferos de um lago de água preta da Amazônia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. Pp 39.
- Brandão, L. P. M; Pujoni, D. G. F; Maia-Barbosa, P. M. 2014. Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge, 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for *in situ* evaluation. *Brazilian Journal of Biology*, 74 (3): 642-648.
- Bosma, R. R; Verdegem, M. C. J. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limits. *liveStoke Science*. 139: 58-68.
- Brendonck, L. & De Meester, L. 2003. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 49: 65–84.
- Cáceres, C. E. 1998. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, 79 (5): 1699-1710.
- Carvalho, G. R; Wolf, H. G. 1989. Resting eggs of lake-*Daphnia*. I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshwater Biology*, 22: 459–470.
- Conde-Porcuna, J. M. Ramos-Rodríguez, E. Pérez-Martínez, C. 2014. In situ production of empty ephippia and resting eggs by an obligate parthenogenetic *Daphnia* population. *Journal of Plankton Research*, 36(1): 157-169.
- Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55) 110 pages Onbé, T., 1978. Sugar floatation

- method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea bottom sediment. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 44: 1141.
- De Stasio, B. T., JR. 1989. The seed bank of a freshwater crustacean: Copepodology for the plant ecologist. *Ecology*, 70: 1377-1389.
- De Stasio, B. T., JR. 1990. The role of dormancy and emergence patterns in dynamics of a freshwater zooplankton community. *Limnology and Oceanography*, 35(5): 1070-1090.
- Dinh, H.D.K.; Tran, T.H.N.; Lu, T.L.; Nghiep, T.H.; Le, P.N.; Do, H.L.C. 2018. The effect the food, light intensity and tank volume on resting eggs production in *Daphnia carinata*. *Journal of Environmental Management*, 217: 226-230.
- Eskinazi-Sant'Anna, E. M. & Pace, M.L. 2018. The potential the zooplankton resisting-stage bank to restore communities in permanent and temporary waterbodies. *Journal the Plankton research*, 40(4): 458-470.
- Elmoor-Loureiro, L.M.A. 1997. Manual de Identificação de Cladóceros Límnicos do Brasil. Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil. 155 pp.
- FAO. 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.
- Gabaldóna, C; Busevab, Z; Illyováč, M; Seda, J. 2018. Littoral vegetation improves the productivity of drainable fish ponds: Interactive effects of refuge for *Daphnia* individuals and resting eggs. *Aquaculture*, 485: 111-118.
- Gyllstrom, M.; Hanson, A. L. 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66: 274-295
- Hairston, N.G., Hansen, A.M. & Schffner, W.R. 2000. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage. *Freshwater Biology*, 45: 133-145.
- Hairston, N. G. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *limnology and oceanography*, 41(5), 1087-1092.
- Hobæk, A. and P. Larsson, 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, 71: 2255–2268.
- Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B.; Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for

- quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55) 110 pages.
- Loureiro, B. R.; Costa, S.M.; Macedo, C. F.; huszar, V. L. M.; Branco, C.W.C. 2011. Comunidade zooplanctonica em sistemas de criação de peixes. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(1): 47-60.
- Malla, S.; Banik, S. 2015. Production e application of live food organisms for freshwater ornamental fish larviculture. *Advances in bio research*, 6(1): 159-167.
- Pal, R.; Choudhury, A.K. 2014. An introduction to phytoplanktons: Diversity and Ecology. 1da ed. Ruma Pal e Choudhury, Índia, 175p.
- Pérez-Martínez, C.; Jiménez, L.; Moreno, E; Conde-Porcuna, J. M. 2013. Emergence pattern and hatching cues of *Daphnia pulicaria* (Crustacea, Cladocera) in na alpine lake. *Hydrobiologia*, 707: 47-57.
- Ricci, C. 2001. Dormancy Patterns in rotifers. *Hydrobiologia*. 11(1): 446-447.
- Rottmann R.W., Graves S.J., Watson C., Roy P. and Yanong E. (2017). Culture techniques of *Moina*: The ideal *Daphnia* for feeding freshwater fish fry. CIR 1054, FAO, Rome: 2-9.
- Santeiro, R.M; Pinto-Coelho, R.M. 2000. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado para alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG. *Acta Scientiarum*, 22(3):707-716.
- Sipaúba-Tavares, L. H; Rocha, O. 1994. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II – Organismos Zooplanctônicos. *Biotemas*, 7 (1 e 2): 94-109
- Sipaúba-Tavares, L. H; Rocha, O. 2003. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos 2 ed. São Carlos: RiMa 122p.
- Sipaúba-Tavares, H. L.; Alvarez, E. J. S.; Braga, F. M. S. 2008. Water quality and zooplankton in tanks with larvae of *Brycon Orbinyanus* (Valenciennes, 1949). *Brazilian Journal Biology*, 68(1): 77-86.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Seto, L.M.; Millan, R.N. 2014. Seasonal variation in biotic and abiotic parameters in parallel neotropical fishponds. *Brazilian Journal Biology*, 74(1): 166-174.

- Stross, R. G. 1966. Light and Temperature Requirements for Diapause Development and Release in *Daphnia*. *Ecology*, 47 (3): 368-374.
- Stross, R. G. 1996. Significance of photoperiodism and diapause control in the multicycle Crustacean *Daphniu pulex* Leydig. *Hydrobiologia*. 320: 107-117.
- Stross, R. G. 1971. Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. IV. Light and CO₂-sensitive phases within tile cycle of activation. *Biol. Bull*, 140: 137-155.
- Santeiro, R.M; Pinto-Coelho, R.M. 2000. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado para alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG. *Acta Scientiarum*, 22(3):707-716.
- Ventura, R. F. & Enderez, E. M. 1980. Preliminary studies on *Moina* sp. production in freshwater tanks. *Aquaculture*, 21: 93-96.
- Watanabe, T.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.

Capítulo II
EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO
DE OVOS DE RESISTÊNCIA DE *Moina micrura* KURTZ, 1984, EM
CULTIVOS EXPERIMENTAIS

Titulo

Renan Gomes do NASCIMENTO^{1*} Edinaldo Nelson dos SANTOS-SILVA¹

¹Laboratório de Plâncton - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Manaus, Amazonas Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, Amazonas – CEP 69060-001

*Autor correspondente: renaan112@gmail.com

Resumo

A produção de formas dormentes durante o cultivo do zooplâncton é prejudicial, uma vez que diminui o crescimento da população, o que não é desejável quando se precisa desses organismos disponíveis em grandes quantidades e ao serem ingeridos pelas

larvas dos peixes, podem matar. Baixa disponibilidade de alimento e o aumento da densidade populacional têm sido relatados como uns dos principais fatores que contribuem para que zooplâncton produza formas dormentes. No laboratório, nós testamos primeiramente o efeito de diferentes densidades de fitoplâncton na produção de formas dormentes de *Moina micrura*. No segundo experimento, nós testamos o efeito de diferentes densidades de *Moina micrura* na produção de formas dormentes dessa mesma espécie. A densidade do fitoplâncton foi preponderante para a reprodução assexuada prevalecer na população durante o período de estudo. Não encontramos relação entre o aumento da densidade populacional e a produção de formas de resistência neste estudo. A manipulação da densidade do fitoplâncton pode ser utilizada para induzir a produção de formas dormentes e estes, serem utilizados para iniciar novas culturas.

Palavras-chave: Zooplâncton, Fitoplâncton, Cladóceros, Alimento vivo.

Abstract

The production of resting eggs during the zooplankton's cultivation is harmful since it reduces population growth, which is not desirable when these organisms availability is needed in large quantities and when ingested by fish larvae can cause death. Low food availability and increasing population density has been reported as one of the major contributing factors for zooplankton to produce dormant forms. In the laboratory, we first tested the effect of different densities of phytoplankton on the production of resting eggs of *Moina micrura*. In the second experiment, we tested the effect of different densities of *Moina micrura* on the production of resting eggs of the same species. The density of phytoplankton was preponderant for asexual reproduction prevailing in the population during the period of study. We didn't find a relation between the increase in population density and the production of resting eggs in this study. Phytoplankton density manipulation can be used to induce the production of resting eggs and these used to initiate new cultures.

Key-words: Zooplankton, Phytoplankton, Cladocerans, Live food.

Introdução

O uso do alimento vivo na piscicultura, principalmente nos estágios iniciais de vida dos peixes é indispensável, pois, oferece uma série de benefícios (Sipauba-Tavares, 2003; Takahashi et al., 2010; Pedreira et al., 2015). Os microcrustáceos cladóceros, são comumente utilizados como alimento vivo, pois, apresentam características próprias como forma, tamanho, enzimas digestivas e alto valor nutricional, atendendo as exigências nutricionais das larvas, garantindo melhor

crescimento e sobrevivência (Watanabe et al., 1983; Sipaúba-tavares & Pereira, 2008; Gonçalves et al., 2019). A obtenção do alimento vivo pode ser feita por meio de coletas no ambiente natural ou podem ser cultivados em condições controladas, que é mais favorável, pois, permite que o produtor sempre tenha o alimento vivo disponível, além de evitar a contaminação por agentes patógenos presentes no ambiente natural (Rottmann et al., 2017).

Os locais normalmente utilizados para a produção em grande escala, são tanques escavados, considerados ambientes dinâmicos, principalmente em relação a alteração na composição e densidade do fitoplâncton, item importante na dieta dos cladóceros (Rottmann et al., 2017). O crescimento do fitoplâncton nesses ambientes depende da fertilização, na qual são utilizados fertilizantes orgânicos ou industriais como fonte de nutrientes. Diversos trabalhos sobre o uso de fertilizantes orgânicos e industriais foram realizados (Saint-Jean & Bonou, 1994; Santeiro & Pinto-Coelho, 2000; Sipaúba-Tavares, 2008; Loureiro et al., 2011) e, concomitantemente a estes, o acompanhamento do desempenho da população em sistemas de cultivo em grande escala, os autores concluíram que os principais fatores envolvidos no processo de crescimento populacional, é a quantidade e a qualidade do alimento presente no ambiente, bem como a qualidade da água.

Mudanças brusca na composição e densidade do fitoplâncton, podem alterar o modo reprodutivo dos cladóceros (Alekseev & Lampert, 2004). Esses organismos se reproduzem por partenogênese cíclica, onde a fase assexuada prevalece, desde que as condições estejam favoráveis, na qual a fêmea produz de 4 a 40 progênies, se desenvolvendo em um período de 24-48 horas, dependendo da espécie (Hardy & Ducan, 1994), entretanto, em condições adversas, exemplo, a diminuição do alimento, aumento na densidade populacional, esses organismos passam a se reproduzir sexualmente, e quando isso ocorre, o embrião entra em dormência, podendo permanecer nesse estado por longos períodos, além disso, no máximo dois embriões são produzidos por vez (Rottmann et al., 2017).

Após a formação da forma dormente, elas liberadas na coluna d'água e muitas podem afundar, se acumulam no sedimento, formando um banco de ovos, sendo capazes de resistirem a condições extremas (dessecação, baixas concentrações de oxigênio, extremas temperaturas e alta salinidade) podendo permanecer viáveis por

décadas ou até mesmo séculos e, eclodem quando expostos a estímulos adequados. Se as condições do local forem favoráveis, podem recolonizar o ambiente e restabelecer a população à sua condição inicial (Hairston et al., 2000; Gyllstrom & Hanson, 2004; Couto et al., 2013). Porém, uma vez que o objetivo da produção em grande escala é obter o zooplâncton em grandes quantidades, não é desejável que essas formas sejam produzidas.

Apesar de já existirem trabalhos (Santeiro & Pinto-Coelho, 2000; Sipaúba-Tavares, 2008; loureiro et al., 2011) sobre a produção dos cladóceros em tanques, nenhum deles abordaram a produção de formas dormentes durante o processo de cultivo, que podem causar a morte das larvas. O compartimento que envolve os embriões em dormência é composto de quitina, e as larvas não tem a capacidade de digeri-los e, acabam acumulando-se ao longo do trato digestivo, causando prolapso retal e morte (Com. Pessoal., Gonçalves dados não publicados).

Portanto, entender em quais condições os cladóceros produzem as formas dormentes, provê informações básicas que serviram como subsídios para a formulação de protocolos de cultivo de cladóceros em grande escala. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo, testar em laboratório a relação da disponibilidade do alimento e da densidade populacional sobre a produção de formas dormentes.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no laboratório de Plâncton do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Campu II. Para a realização dos experimentos o cladóceros *Moina micrura* (Kurz 1874) foi utilizado, pois, é uma espécie normalmente encontrada em tanques de piscicultura. A espécie de alga utilizada foi *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890), espécie indicada como ótimo alimento para alimentar organismos planctônicos.

Coleta e aclimação de *Moina micrura*: A coleta foi realizada com o auxílio de uma rede de plâncton com 68 µm de abertura de malha, em um tanque de alvenaria, localizado na Estação de Aquicultura do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Campus III, posteriormente foi levada para o Laboratório de Plâncton localizado no mesmo instituto de pesquisa. Uma alíquota de 2,5 mL foi retirada e adicionada em

uma placa de petri para ser feita a triagem. Cinquenta fêmeas adultas foram isoladas em um béquer de 2 litros contendo água destilada e *Chlorella vulgaris* (1×10^6 cells/mL), foram mantidos em uma incubadora (Modelo EL202), mantidas em 12h com luz e 12h sem luz a 30 °C e alimentados diariamente uma vez ao dia até a realização do experimento.

Coleta e aclimação de de *Chlorella vulgaris*: A coleta foi no mesmo lugar descrito anteriormente, utilizado um tubo PVC de 1,5 de comprimento e 60 mm de diâmetro, acoplado com uma válvula para retenção da água em uma das extremidades. A água retida no tubo foi acondicionada em um balde, homogeneizada e uma amostra de 250ml foi retirada, posteriormente foi levada para o Laboratório de Plâncton para o isolamento das algas, seguindo o protocolo de Lourenço (2006).

Experimento de indução a produção de ovos de resistência de *M. micrura* sobre diferentes concentrações de alimento: Constituído por três tratamentos com diferentes concentrações de alimento (Figura 1). Para cada tratamento foi utilizado 15 béqueres de 600 mL, com 15 indivíduos de *M. micrura* cada. O experimento se estendeu por 15 dias. A cada dia, um béquer de cada tratamento foi retirado e analisado. O tratamento 1 (A1) foi com uma densidade 5×10^3 células de algas por mL, o tratamento 2 (A2) 5×10^4 células de algas por mL, o tratamento 3 (A3) 5×10^6 células algas por mL, os organismos foram alimentados diariamente (1x). A densidade de algas foi calculada utilizando câmara de Sedgewick-Rafter (Gilbert, 1942). Após este procedimento os béqueres foram colocados em uma câmara incubadora (Modelo EL202), com 30°C, fotoperíodo 12horas/12horas.

Após 24 horas foi feita a primeira observação. Diariamente, foi retirado um béquer de cada tratamento para enumeração de fêmeas carregando efípios, efípios já liberados, número de indivíduos e densidade de algas.

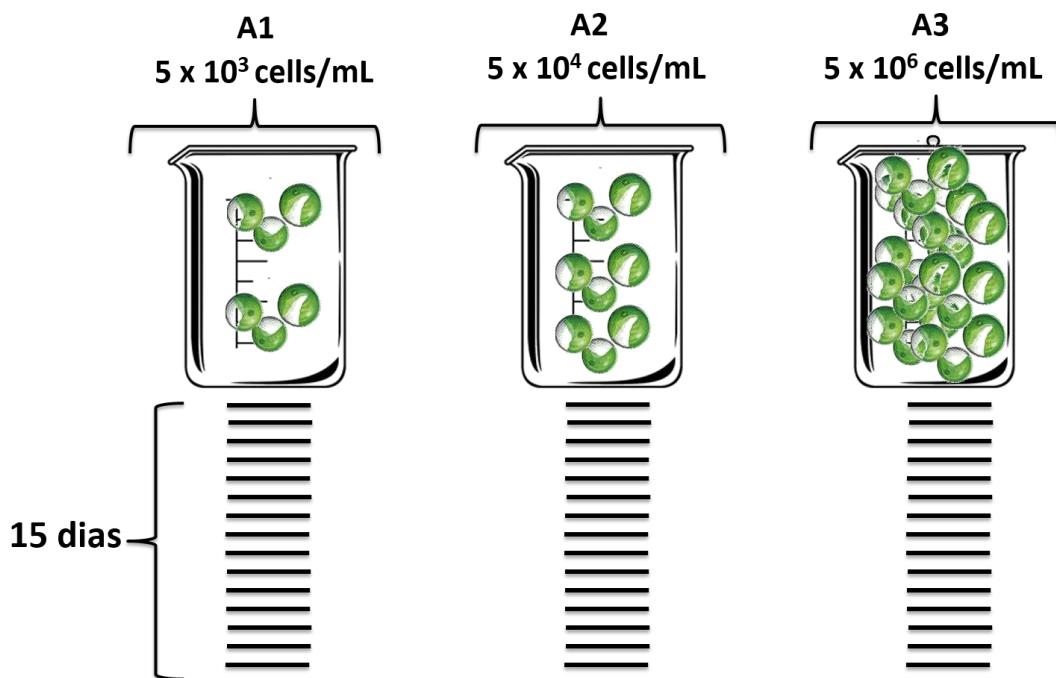


Figura 1: Desenho experimental do experimento com diferentes concentrações de alimento.

Experimento de indução a produção de ovos de resistência de *M. micrura* sobre diferentes densidade de *M. micrura*: Constituído por três tratamentos com diferentes densidades de *M. micrura*, com a mesma densidade de algas 5×10^6 células por mL (Figura 2). Para cada tratamento foi utilizado 15 béqueres de 600mL. A cada dia, um béquer de cada tratamento foi retirado e analisado. O experimento teve duração de 15 dias. No tratamento 1 (C1) foram colocados 5 indivíduos por béquer, no tratamento 2 (C2) 15 indivíduos por béquer e no tratamento 3 (C3) 30 indivíduos por béquer. Após este procedimento os béqueres foram colocados em uma câmara incubadora (Modelo EL202), 30°C, fotoperíodo 12 horas/12horas. Diariamente foi retirado um béquer de cada tratamento, para enumeração de fêmeas carregando efípios, efípios já liberados, número de indivíduos e densidade de algas, para ser feita a reposição.

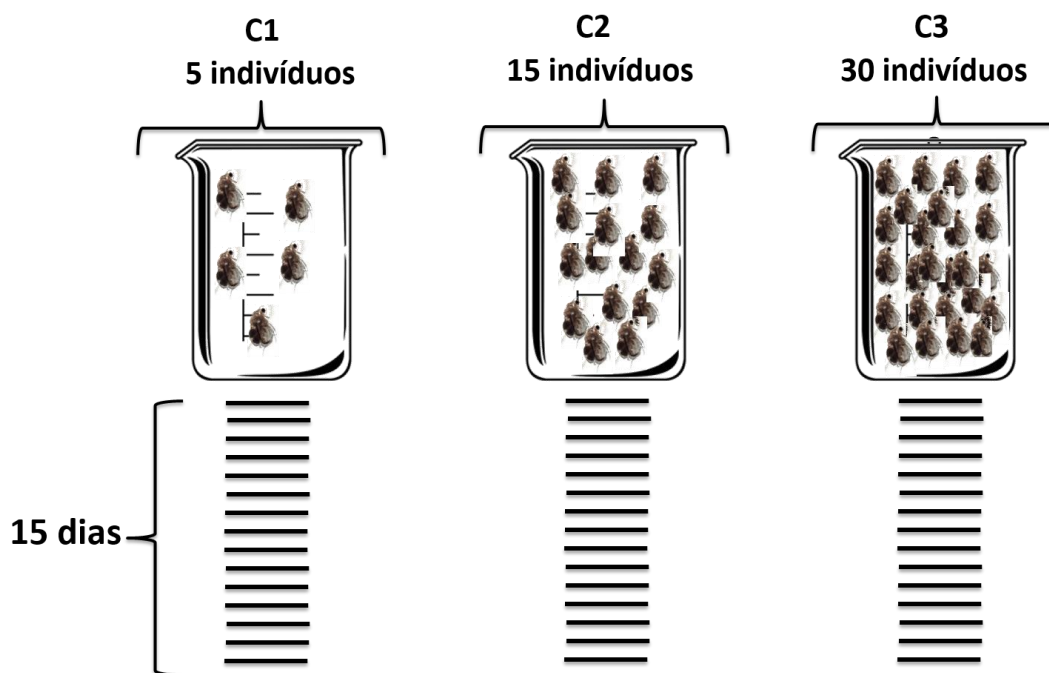


Figura 2: Desenho experimental do experimento com diferentes densidades de *M. micrura*.

Análise estatística

Foi feito o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. As análises foram feitas por meio do teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de $p < 0,05$. Para verificar se houve diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos foi realizado o teste de posc-hoc de Dunn, com nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.3.2.

Resultados

Experimento de indução a produção de ovos de resistência de *M. micrura* sobre diferentes concentrações de alimento:

No presente estudo sobre a produção de formas dormentes, houve diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis $p = 0,0005$) entre os tratamentos. O A2 foi encontrado o maior número de efípias com 291 ovos, seguido do A3 com 11 e A1 com 6. Os efípias só foram observados a partir do 4º dia nos tratamentos A2 e A3 e, A1 somente no 11º dia (Figura 3). Os tratamentos A2 e A3 tiveram a melhor performance,

atingindo um pico máximo em suas densidades entre o 7º e 8º dia, seguido de mais dois picos (figura 4).

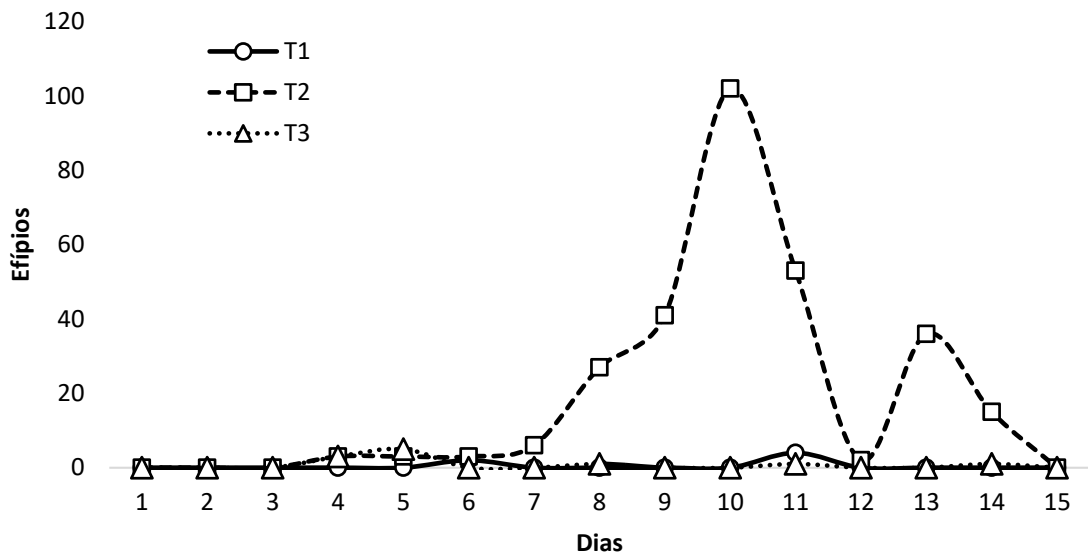


Figura 3. Ilustração gráfica da produção de efípios por *M. micrura*.

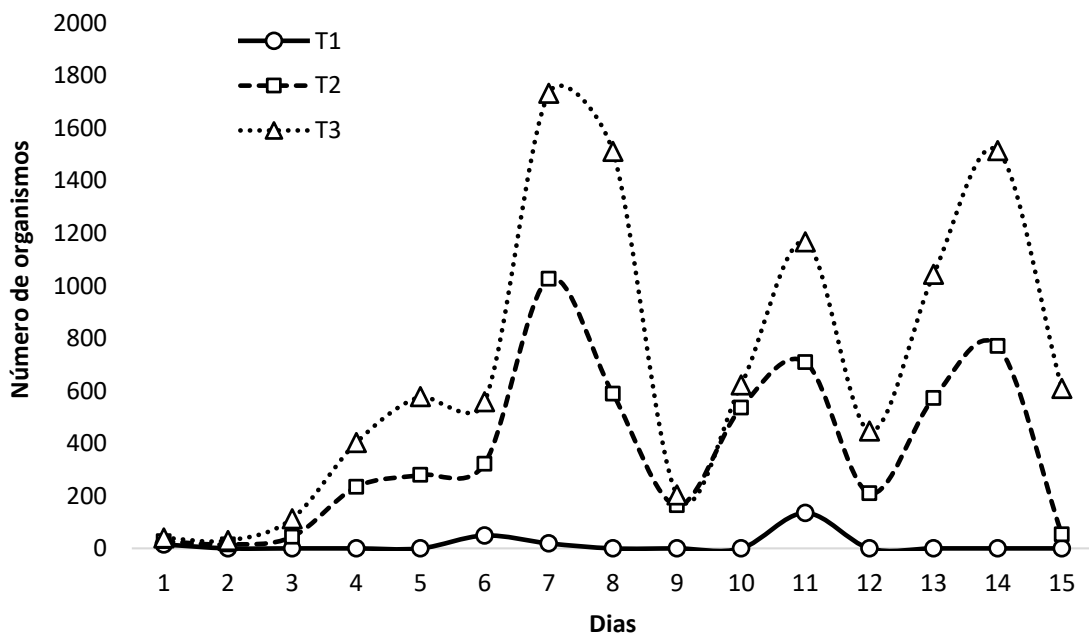


Figura 4. Ilustração gráfica do crescimento populacional de *M. micrura*.

Experimento de indução a produção de ovos de resistência sobre diferentes densidade de *M. micrura*:

Não foi encontrado diferença estatística significativa na produção de efípios (Kruskal-Wallis $p=0,05218$) entre os tratamentos. O C3 foi encontrado o maior número de efípios com ovos 271, seguido do C2 com 207 e C1 com 56 (Figura 5). Os efípios foram observados a partir do 4º dia no C3, 10º no C2 e 13º no C1. Os tratamentos C1 e C3 tiveram a melhor performance, atingindo um pico máximo em suas densidades entre o sétimo e nono dia respectivamente (Figura 6).

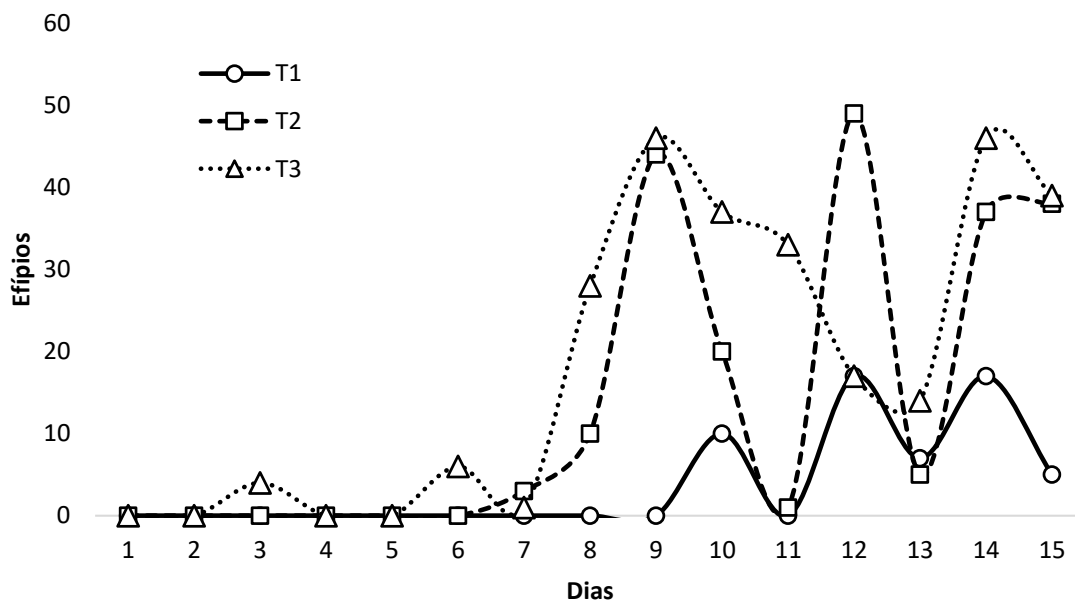


Figura 5. Ilustração gráfica da produção de efípios por *M. micrura*.

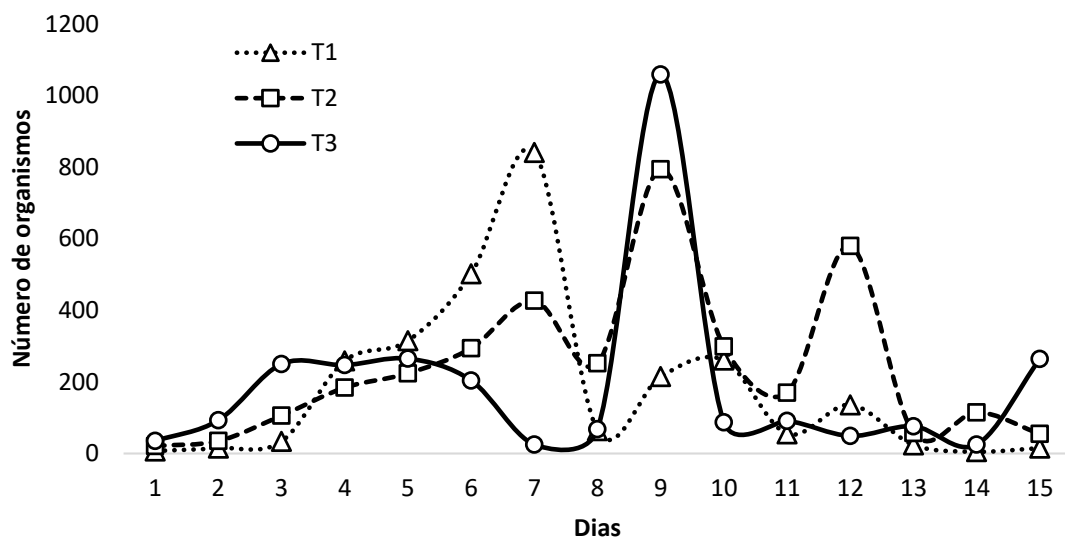


Figura 6. Ilustração gráfica do crescimento populacional de *M. micrura*.

Discussão

Fotoperíodo, temperatura, alimento e densidade populacional, podem alterar o ciclo reprodutivo dos cladóceros (assexuada/sexuada) (Stross, 1996; Alekseev & Lampert, 2001; Abrusán et al, 2007; Dinh et al., 2018). No presente estudo, testamos o efeito da concentração do alimento e da densidade populacional, em experimentos separados, sobre a produção de efípios em *M. micrura*, com o intuito de descobrir como esses dois fatores podem contribuir para a produção de efípios em sistemas de cultivo, visto que a produção dessas formas dormentes tem uma série de implicações para a piscicultura (Brendonck & De Meester, 2003; Graf & Resgalla Jr, 2017).

Em nosso estudo, ficou evidente que a concentração do alimento influenciou tanto o crescimento populacional, quanto a produção dos efípios. No experimento com a menor concentração de alimento (5×10^3 cells/ml), a sobrevivência foi muito baixa, acarretando em uma baixa densidade populacional e um número insignificante de formas dormentes produzidas em relação aos demais ambientes experimentais. Certamente esses resultados são explicados devido à importância da quantidade do alimento no ambiente para a reprodução em cladóceros, uma vez que grande parte

da energia armazenada, é investida na reprodução (Lampert, 1994; Alekseev & Lampert, 2004). A produção de formas dormentes é energeticamente mais custosa do que em ovos partenogenéticos, além disso, ovos de resistência necessitam de uma alocação maior de nutrientes, que lhe proporcionará uma maior viabilidade e longevidade (Abrusán et al, 2007; Koch et al., 2009). Desta forma, a disponibilidade do alimento em quantidade adequadas é essencial para que os cladóceros possam investir na reprodução assexuada. Portanto, não recomendamos concentrações de alimento abaixo de 5×10^5 cells/ml para o cultivo de *M. micrura*, para quando se pretende obter grandes densidades.

A performance da *M. micrura* nos experimentos com diferentes concentrações de alimento (exceto 5×10^3 cells/ml) e diferentes densidades populacionais, são satisfatórios referente ao crescimento populacional, que atingiram o pico na densidade entre o 7º e 9º dia, um padrão conhecido para cladóceros cultivados em grande e pequena escala, corroborando Hardy & Duncan (1994), Sipaúba-Tavares & Pereira (2008), que relataram que a concentração do alimento foi preponderante no número de progênies produzidas e na sobrevivência de cladóceros. Com os resultados obtidos referente ao crescimento populacional, sugerimos que a replicação da cultura seja feita entre o 5º e 6º dia para volumes maiores, pois, no presente estudo, esse intervalo de tempo, se dá ao crescimento exponencial da população, isso permitirá que o produtor obtenha uma maior quantidade de indivíduos, no final do ciclo de cultivo.

A manipulação na concentração do alimento como “ferramenta” para induzir a produção de efípio e/ou para manter na população a reprodução partenogenética em *M. micrura* foi eficaz, como observado no presente estudo. O experimento com concentração intermediária (5×10^5 cells/ml), foi o que mais produziu efípios. Entretanto, vale ressaltar que a produção de efípios nos ambientes experimentais, só aumentaram após a população atingir o pico na densidade. Resultados semelhantes também foram observados por outros autores (Azuraidi et al., 2013; Graf & Resgalla Jr, 2017). Segundo Forró (1997), o acasalamento em cladóceros, envolve processos de encontro, posicionamento e copula e, a taxa de encontro entre fêmeas e machos é afetada pela densidade populacional (La et al., 2014). Nossos resultados corroboram as observações dos respectivos autores e, destacamos que a concentração do alimento deve estar disponível em quantidade suficiente, para

permitir que os cladóceros possam atingir grandes densidades, aumentando a probabilidade de encontros entre ambos sexos e conseqüentemente a produção de efípios, quando desejado, uma vez que essas formas dormentes servem para iniciar cultivos.

Com os resultados apresentados, o presente estudo contribui com informações relevante que irão ajudar a compreender melhor sobre a produção de efípios por *M. micrura*. Essas informações serão úteis para entender a dinâmica populacional em sistemas de cultivos. Além disso, a produção em grande escala dessas formas de resistência por meio da manipulação da concentração do alimento no ambiente, podem ser utilizadas como inoculos, para iniciar cultivos em grande e pequena escala, que podem ser utilizados na aquicultura, substituindo os cistos de *Artêmia*, que tem um custo elevado, além da dificuldade em manter os organismos vivos por muito tempo, ou podem servir para teste ecotoxicológicos. Portanto, consideramos que estudos futuros realizem testes de viabilidade e métodos de armazenamento dos efípios, garantindo assim que o produtor possa sempre ter esses organismos disponíveis para alimentar suas larvas.

Conclusão

Com os resultados alcançado nesse estudo, foi possível constatar que manter o fitoplâncton em alta densidade (acima de 5×10^6 cells/ml) é essencial para a reprodução assexuada prevalecer na população, conseqüentemente, alcançando maiores densidades.

Referências

- Alekseev, V; Lampert, W. 2004. Maternal effects of photoperiod and food level on life history characteristics of the cladoceran *Daphnia pulicaria* Forbes. *Hydrobiologia*, 526: 225–230.
- Azuraidi, O. M; Yusoff, F. M; Raha, R. A; Alekseev, V. R; Matias-Peralta, H. M. 2013. Effect of food density on male appearance and ephippia production in a tropical cladoceran, *Moina micrura* Kurz, 1874. *Aquaculture*, 412–413: 131–135.

- Abrusán, G.; Fink, P.; Lampert, C. 2007. Biochemical limitation of resting egg production in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 52(4): 1724-1728.
- Brendonck, L. & De Meester, L. 2003. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 49: 65–84.
- Couto, C. A. 2013. Comunidade ativa e dormente de Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) no lago Tupé, Manaus-AM. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 86p.
- Dinh, H.D.K.; Tran, T.H.N.; Lu, T.L.; Nghiep, T.H.; Le, P.N.; Do, H.L.C. 2018. The effect of food, light intensity and tank volume on resting eggs production in *Daphnia carinata*. *Journal of Environmental Management*, 217: 226-230.
- Forró, L. 1997. Mating behaviour in *Moina brachiata* (Jurine, 1820) (Crustacea, Anomopoda). In: A. Brancelj, L. De Meester & P. Spaak (eds), *Cladocera: The Biology of Model Organisms*. Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium.
- Gilbert, J.Y. 1942, 'The errors of the Sedgwick-Rafter counting chamber on the enumeration of phytoplankton', *Transactions of the American Microscopy Society*, 61, 217–226.
- Graf, P. O. T.; Resgalla, JR., C. 2017. Produção e viabilidade de ovos de resistência do cladocera *Daphnia magna* Straus, 1820 em cultivo intensivo. *Brazilian Journal Science and Technology*, 21(1): 44-50.
- Gonçalves, L.U.; França, L.A.; Epifânio, C.M, et al. 2019. Ostracoda impairs growth and survival of *Arapaima gigas* larvae. *Aquaculture*, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.012>.
- Gyllstrom, M.; Hanson, A. L. 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66: 274-295
- Hairston, N.G., Hansen, A.M. & Schffner, W.R. 2000. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage. *Freshwater Biology*, 45: 133-145.
- Hardy, E. R.; Ducan, A. 1994. Food concentration and temperature effects on life cycle characteristics of tropical Cladocera (*Daphnia gessneri* Herbst, *Diaphanosoma sarsi* Richard, *Moina reticulata* (Daday)): I. Development time. *Acta Amazonica*, 24(1/2): 119-134.

- Koch, U; Eric, E. V; Straile, D. 2009. Food quality triggers the reproductive mode in the cyclical parthenogen *Daphnia* (Cladocera). *Oecologia*,159: 317–324.
- La G-H, Choi J-Y, Chang K-H, Jang M-H, Joo G-J, et al. (2014) Mating behavior of *Daphnia*: impacts of predation risk, food quantity, and reproductive phase of females. *PLoS ONE* 9(8): e104545 doi:10.1371/journal.pone.0104545.
- Lampert, W. 1994. Phenotypic plasticity of the filter screens in *Daphnia*: Adaptation to a low-food environment. *Limnology and Oceanography*, 39(5): 997-1006.
- Loureiro, B. R.; Costa, S.M.; Macedo, C. F.; huszar, V. L. M.; Branco, C.W.C. 2011. Comunidade zooplânctonica em sistemas de criação de peixes. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(1): 47-60.
- Lourenço, S. O. 2006. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. Ed Rima, São Carlos, 2006. 606p.
- Pedreira, M. M; Schorer, M; Ferreira, A. L. 2015. Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação de larvas de tambaqui. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 16 (2): 440-448.
- Rottmann R.W., Graves S.J., Watson C., Roy P. and Yanong E. (2017). Culture techniques of *Moina*: The ideal *Daphnia* for feeding freshwater fish fry. CIR 1054, FAO, Rome: 2-9.
- Sampaio Nakauth, A. C. S.; Muller, R. L. ; Villacorta-Correa, M. A. ; Acioli, A. N. S. ; Almeida, R. . Crescimento populacional do cladocera *Moina* sp. Em sistema de cultivo estático. Anuário do instituto natureza e cultura/ufam, 01: 18.
- Saint-Jean, L. & Bonou, C. A. 1994. Growth, production, and demography of *Moina micrura* in brackish tropical fishponds (Layo, Ivory Coast). *Hydrobiologia*, 272: 125-146.
- Santeiro, R.M; Pinto-Coelho, R.M. 2000. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado para alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG. *Acta Scientiarum*, 22(3):707-716.
- Sipaúba-Tavares, L. H; Rocha, O. 2003. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos 2 ed. São Carlos: RiMa. 122p.

- Sipaúba-Tavares, H. L.; Alvarez, E. J. S.; Braga, F. M. S. 2008. Water quality and zooplankton in tanks with larvae of *Brycon Orbinyanus* (Valenciennes, 1949). *Brazilian Journal of Biology*, 68(1): 77-86.
- Stross, R. G. 1996. Significance of photoperiodism and diapause control in the multicycle Crustacean *Daphnia pulex* Leydig. *Hydrobiologia*, 320: 107-117.
- Takahashi, L. S.; Silva, T. V.; Fernandes, J. B. K.; Biller, J. D.; Sandre, L. C G. 2010. Efeito do tipo de alimento no desempenho produtivo de juvenis de Acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(1): 1-8.
- Watanabe, T.; Kitajima, C. and Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.