



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

*Diferentes aplicações da microalga *Arthrospira platensis* na produção de camarão
branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*.*

Joaquin Macias Sancho

Rio Grande, RS

2018

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

*Diferentes aplicações da microalga **Arthrospira platensis** na produção de camarão
branco do Pacífico **Litopenaeus vannamei**.*

*Tese apresentanda ao Programa
de Pós Graduação em Aquicultura
da Universidade Federal do Rio
Grande FURG como requisito parcial
à obtenção do título de doutor.*

Aluno: MSc. Joaquin Macias Sancho

Orientador: Dr. Prof. Luis Henrique da Silva Poersch

Co-orientador: Dr. Prof. Marcelo Borges Tesser

Março de 2018

ÍNDICE:

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	4
HIPÓTESES	8
OBJETIVOS	9
OBJETIVO GERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1: Diferentes aplicações da microalga <i>Arthrospira platensis</i> no período de berçário do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema biofoco: Efeitos no desempenho e sobrevivência	17
Resumo	18
Introdução	18
Material e Métodos	19
Resultados	22
Discussão	25
Conclusão	27
Agradecimentos	27
Referências	27
CAPÍTULO 2: <i>Arthrospira platensis</i> filtrada como alimento complementar de juvenis do camarão branco: efeitos sobre crescimento e sistema imune	32

Resumo expandido	33
Anexo 1	36
CAPÍTULO 3: Dietas experimentais com substituição de farinha de peixe por farinha de <i>Arthrospira platensis</i> para juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i>: efeitos no crescimento, coloração e peroxidação lipídica	59
Resumo expandido	60
Anexo 2	62
CAPÍTULO 4: Efeitos da <i>Arthrospira platensis</i> na modulação das comunidades bacterianas no intestino de juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i>	87
Resumo expandido	88
Anexo 33	90
DISCUSSÃO GERAL	103
CONCLUSÕES GERAIS	107
REFERÊNCIAS	108

DEDICATÓRIA

*“Todo pasa y todo queda
Pero lo nuestro es pasar
Pasar haciendo camino
Camino sobre la mar
Nunca perseguí la gloria
Ni dejar en la memoria
De los hombres mi canción
Yo amo los mundos sutiles
Ingravidos y gentiles
Como pompas de jabón*

*Me gusta verlos pintarse
De Sol y grana volar
Bajo el cielo azul temblar
Subitamente y quebrarse
Nunca perseguí la gloria ...*

*Caminante son tus huellas el camino y nada
más
Caminante no hay camino, se hace camino
al andar
Al andar, se hace camino, y al volver la
vista atrás
Se ve la senda que nunca se ha de volver a
pisar
Caminante no hay camino, sino estelas en
la mar”*

Antonio Machado

A mi familia

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores e amigos Luis Henrique Poersch (Mineiro) e Marcelo Borgues Tesser pelos conselhos e apoio no trabalho, compreensão de situações anormais acontecidas durante esses quatro anos, pelos valores e aprendizado da vida. Sem eles esse trabalho não teria acontecido. Muito obrigado.

Especialmente quero agradecer ao Dr. Tesser, quem à base de esticar a corda, brigas e sacolejadas me fez refletir, entrar em ação e sobre todo amadurecer durante esses anos.

Aos professores do programa: Geraldo, Dariano, Ricardo, Luciano, Ronaldo, Cesar, José, Carlos, Paulo, Romano, Mano, Sampaio.

Aos membros da banca cujas contribuições aprimoraram o presente trabalho.

Ao Programa de Pósgraduação em Aquicultura da FURG.

Aos membros do corpo não docente da estação marinha, que sempre estiveram nos momentos apropriados para me ajudar a resolver imprevistos (Andressa, Django, as meninas da limpeza, guardas e ao Senhor Hermes).

Ao CNPq e CAPES pelo importantíssimo apoio financeiro.

À todos os colegas, técnicos e pós doutorandos do curso de pós-graduação em aquicultura. Sem esse time nada seria igual (Aline, Babu, Gabi, Sabrina, Virgínia, Thamyres, Victor, Júlio, Lucas Genésio, Plácido, Mari, Gabriel, Cleber, Daniel, André, Oka, Fabio, Alesandro, Lucas e todos os demais) e estagiários que passaram por aqui nestes anos.

À minha família brasileira: família Paz Martins; onde fui acolhido como um membro à mais com todo o amor evitando que eu me sentisse como um estranho e foi uma fonte de energia inesgotável nesses dias. Sempre estaremos juntos família, porque agora minha família cresceu.

A mi familia, aunque siento profundamente que mis referentes familiares no puedan disfrutar de este Capítulo de mi vida, se que ellos han participado impulsadome hacia lo que me convertirá.

A mi madre, hermanas, tias, primos, sobrinos, por tantos besos y abrazos que me hicieron llegar sorteando mares y montañas.

À Suzana, parte especial durante todo esse caminho. Levantar à procura de novas metas são os grandes aprendizados de ti. Nada seria possível sem tua confiança e espírito guerreiro que me ajudam a continuar em todo momento.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Composição proximal das fontes de alimento no exp. 1	20-21
Tabela 2: Resultados dos parâmetros de qualidade da água ao longo do exp. 1	22-23
Tabela 3: Peso final e Sobrevivência no exp. 1	24
Tabela 4: Composição proximal dos camarões e dos bioflocos no exp.1	24-25
Tabela 5. Desempenho zootécnico no exp. 2	34
Tabela 6. Composição proximal dos camarões ao final do exp. 2	34
Tabela 7: Parâmetros imunológicos dos camarões no exp. 2	34-35
Anexo 1	
Tabela 1. Parâmetros da qualidade da água	43-44
Tabela 2. Composição das fontes alimentares	44
Tabela 3. Desempenho zootécnico no experimento 2	44-45
Tabela 4. Composição proximal dos camarões ao final do exp. 2	45
Tabela 5: Parâmetros imunológicos de camarões no exp. 2	46
Tabela 8: Desempenho zootécnico, sobrevivência e apoptose no exp. 2	60-61
Tabela 9: Coloração e concentração de carotenóides de camarões no exp. 2	61
Tabela 10: Parâmetros do efeito antioxidante de camarões no exp. 2	61
Anexo 2	
Tabela 1: Composição proximal dos ingredientes e rações no exp. 3	66-68
Tabela 2: Perfil de aminoácidos das rações utilizadas no exp. 3	68
Tabela 3: Desempenho zootécnico, sobrevivência no exp.3	72
Tabela 4: Coloração e concentração de carotenóides dos camarões no exp. 3	72-73
Tabela 5: Porcentual de hemócitos em apoptose do exp. 3	73

Figura 1: Resultados de peroxidação lipídica (TBARS) e formação de pontes dissulfeto não
protéicos em hepatopancreas e músculo de camarão 74

Anexo 3

Tabela 1: Composição proximal de ingrediente e rações no exp.4 94-95

Tabela 2: Contagens de bactéria Gram positiva no intestino de camarão 96

Figura 1: Concentração de amônia ao longo do exp. 1 23

Figura 2: Coloração Gram positiva no intestino de camarão 89 e 97

1 RESUMO GERAL

2 A presente tese teve como objetivo avaliar diferentes métodos de inclusão da
3 microalga *Arthrospira platensis* no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus*
4 *vannamei* durante as fases de berçário e engorde e seus efeitos na qualidade da água de
5 cultivo, no desempenho, sobrevivência, sistema imunológico e na microbiota do camarão. O
6 primeiro capítulo objetivou a aplicação da cianobactéria *A. platensis* em pó e viva no sistema
7 de produção em bioflocos para enriquecer os agregados microbianos e avaliar os efeitos na
8 qualidade da água e sobrevivência dos camarões. A inclusão de microalga em forma viva
9 influenciou na qualidade da água do meio de cultivo elevando os valores de amônia ionizada
10 no sistema. Porém, esse detrimento na água não provocou efeitos na sobrevivência do
11 camarão obtendo-se maiores valores de sobrevivência nos tratamentos onde foi colocada a
12 cianobactéria que no tratamento controle devido ao seu efeito imunestimulante. Recomenda-
13 se a inclusão de microalga *A. platensis* nos sistemas de produção de pós-larva de camarão
14 branco para atingir melhores sobrevivências. No segundo capítulo se trabalhou com a
15 possibilidade da co-produção da *A. platensis* num sistema super intensivo de água clara de
16 juvenis de camarão branco e a avaliação dos efeitos da cianobactéria no desempenho,
17 sobrevivência, sistema imunológico e a qualidade da água. Durante a fase experimental do
18 tratamento onde foi inoculada, a *A. platensis* atingiu níveis de amônia acima dos
19 recomendados para a produção da espécie, mas os dados de crescimento dos camarões foram
20 maiores para esse tratamento. Também teve uma melhoria nos parâmetros imunológicos
21 quando inoculada a cianobactéria. A co- produção de microalga não foi possível devido a alta
22 densidade de cultivo de camarões utilizada, mas a *A. platensis* demonstrou efeitos positivos
23 no crescimento e no sistema imunológico do *L. vannamei*. O terceiro capítulo avaliou
24 diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por farinha de *A. platensis* (0%, 5,0%,
25 10%, 25%, 50%, e 75%) e a função como pré- biótico da cianobactéria. Juvenis de camarão
26 branco foram alimentados por 49 dias e através de análises histológicas do intestino dos
27 camarões foram encontradas diferenças na deposição de bactérias do tipo Gram positivas,
28 mantendo uma relação linear positiva na presença deste tipo de bactéria com o aumento no
29 nível de substituição de farinha de peixe por farinha da cianobactéria. O quarto capítulo da
30 tese teve como objetivo avaliar os efeitos de seis dietas com níveis de substituição de 0%, 5%,
31 10%, 25%, 50% e 75% de farinha de peixe por farinha de *A. platensis* no desempenho,
32 composição proximal, coloração, conteúdo de carotenóides, sistema imunológico e estado
33 antioxidante em juvenis de *L. vannamei*. Altos níveis de substituição de *A. platensis*

34 provocaram maiores taxas de crescimento, aumento na deposição de proteína no músculo,
35 colorações mais avermelhadas em camarões cozinhados, maiores concentrações de
36 carotenóides no músculo, diminuição na taxa de apoptose e diferenças no estado antioxidante.
37 Os resultados obtidos no presente estudo avaliam a capacidade da microalga *A. platensis*
38 como ingrediente alternativo para as dietas de camarão contribuindo nas melhorias do sistema
39 imunológico e sobrevivência em sistema de produção super intensivos de pós- larvas e juvenis
40 de camarão branco do Pacífico, e os efeitos positivos como pré-biotico, no desempenho,
41 coloração, sistema imunológico e no estado antioxidante de juvenis de camarão em sistemas
42 de produção intensivos em água clara. O uso da microlaga *A. platensis* como ingrediente
43 alternativo a farinha de peixe não influenciará no desempenho dos camarões, incorporará
44 efeitos positivos na saúde dos mesmos e diminuirá o uso de farinha de peixe na formulação de
45 rações para *L. vannamei*.

46

ABSTRACT

47 The present study aimed to evaluate the different methods to apply the microalgae
48 *Arthrospira platensis* in the production system of *Litopenaeus vannamei* during nursery and
49 growth phases and its effects in water quality, performance, survival, immunological system,
50 antioxidant system and microbiota. The first chapter was delineated to know the effects of the
51 application of powder or live microalgae during nursery of *L. vannamei* and their effects on
52 shrimp survival and biofloc composition. The water quality was affected by the microalgae
53 inclusion lead an increase in ammonia concentration. These results no affect in shrimp
54 survival of the treatments with microalgae inclusion achieving higher survival levels than the
55 control treatment. The second chapter aimed the co-production of *A. platensis* and juveniles of
56 *L. vannamei* in super intensive system with clear water. In this study were assessed the water
57 quality, performance, survival and immunological effects of *A. platensis* in juvenile shrimps.
58 The performance and immunological parameters of white shrimp improve in the treatment
59 where he microalga was included. The *A. platensis* crop was unsuccessful by the high density
60 of shrimp settled on experimental units. The third chapter investigated about the effects in
61 performance, coloration, carotenoid concentration, immunological system and antioxidant
62 estate of shrimps feeding of six experimental diets. The diets were formulated with different
63 replacement levels of fish meal by *A. platensis* meal (0%, 5.0%, 10%, 25%, 50%, and 75%) to
64 reduce the fish protein used in aquaculture food. The performance, carotenoids concentration
65 and antioxidative capacities improve in the treatments with higher levels of replacement
66 (25%, 50% and 75%). Shrimp fed with high levels of replacement presented intense redness
67 coloration after boiled than the shrimps fed with control and low replacement level diets. The
68 fourth chapter also evaluated six formulated diets with replacement levels of fish meal by *A.*
69 *platensis* meal and the effects of microalga as prebiotic compounds to shrimps. Lasted 49
70 days were realized histological analyses to assess the different structural bacterial included in
71 shrimp gut. Shrimps fed with higher levels of *A. platensis* diets shown a positive linear
72 relationship with the Gram-positive bacteria occurrence. The results obtained suggested that
73 the microalga *A. platensis* is a promissory ingredient alternative to fish meal in shrimp diets.
74 The microalga contributed increasing the shrimp immunological system, the survival and
75 increases the shrimp performance. The prebiotic effect, the increase of coloration and the
76 positive effects in the antioxidant system in the white shrimp make this microalga as an
77 alternative ingredient with beneficial characteristics. The replacement till 75% of fish meal by
78 *A. platensis* meal decrease the fish meal uses as the main protein source in aquaculture diets.

79 INTRODUÇÃO GERAL

80 Com o aumento populacional mundial, surgem incertezas com respeito à produção de
81 organismos marinhos, seja por pesca ou aquicultura, para atender de forma suficiente esta
82 demanda por parte dos consumidores (Hall e Schaffer, 2015). Por hora, vislumbra-se um
83 aumento do esforço pesqueiro como a opção mais viável a curto prazo. No entanto, essa
84 atividade exploratória se enquadra como a possibilidade menos sustentável. O Painel
85 Intergovernamental sobre Mudança Climática, em inglês Panel on Climate Change (IPCC),
86 prevê mudança das áreas geográficas globais de diferentes espécies marinhas, fato que
87 influenciará negativamente na biodiversidade marinha regional e conseqüentemente na
88 produtividade pesqueira (Dinesh, 2016).

89 Estratégias pesqueiras visando o controle na expedição de novas licenças de pesca,
90 criação de zonas de proteções ambientais marinhas, instituição de épocas de defeso ou
91 mudanças de espécies alvo vem sendo impostas pelos diferentes estados visando assegurar o
92 volume de pescarias (Patrick e Link, 2015). A seleção de espécies alvo nos períodos
93 apropriados pode permitir pescas maiores e assegurar a subsistência dos estoques (Gwinn et
94 al., 2015). No entanto, o aumento de volume de captura é incerto uma vez que as regras
95 criadas são regionais e geralmente não ultrapassam fronteiras.

96 Segundo dados de World Fish, em 2030 o mundo precisará de aproximadamente 88
97 milhões de toneladas de pescado (peixes, crustáceos e mariscos) adicionais para satisfazer a
98 demanda mundial de proteína de origem aquática, sendo que desse volume 63 milhões devem
99 ser oriundas da aquicultura (de la Llave, 2018).

100 Para obter este aumento de pescado a médio e longo prazo, imagina-se que os esforços
101 devam ser centrados em três grandes eixos: 1) reduzir o desperdício através do
102 aproveitamento do rejeito no sistema de produção como alimento para peixes; 2) aumentar a
103 pesca pela captura de estoques no momento de maior produtividade; 3) intensificar a
104 produção da aquicultura (Hall, Schaffer, 2015).

105 Considerando este último fator, Mo et al. (2018) indicaram a importância do
106 aproveitamento dos dejetos de pescado na alimentação na aquicultura o qual é limitado até a
107 data. Froehlich et al. (2017) relatam que mediante a colaboração, planejamento estratégico e
108 práticas de monitoramento a aquicultura servirá como fonte de recurso à serviço da
109 conservação. Isto vem sendo observado especialmente na última década através de evoluções
110 tecnológicas, melhoria no manejo dos sistemas de produção e redução dos problemas
111 ambientais causados pela atividade (Edwards, 2015).

112 Os sistemas de produção de organismos aquáticos apresentam diversas
113 particularidades, que influenciam na capacidade de suporte de um viveiro ou tanque, passando
114 pela saúde dos animais e pela viabilidade econômica da atividade. Segundo Bostock et al.
115 (2010), o desenvolvimento de cultivos sustentáveis implicam na seleção de espécies
116 adequadas para aquele ambiente, na manutenção da saúde animal e no aprimoramento de
117 rações que proporcionem o melhor custo-benefício.

118 A farinha de peixe (FP) é o principal ingrediente das rações artificiais utilizadas na
119 aquicultura devido a seu alto valor nutricional, elevado teor de proteína e alta digestibilidade
120 (Tacon e Metian, 2015). A dependência desse ingrediente gera um grande risco para a
121 aquicultura devido às oscilações na qualidade, preço e disponibilidade do produto (Glencross
122 et al., 2007). Apesar da farinha e óleo de peixe serem as formas mais efetivas para a inclusão
123 de proteína e gordura nas dietas de espécies carnívoras e onívoras cultivadas, não são
124 essenciais (Tacon e Metian, 2008).

125 Com a expansão da aquicultura tem-se a necessidade de incrementar o uso de
126 ingredientes alternativos nas rações (Glencross et al., 2007). A dependência por fontes de
127 alimentos marinhos é contornada através da melhoria dos ingredientes substitutos da farinha
128 de peixe (Naylor et al., 2009). Visando gerar ingredientes de qualidade sem afetar o
129 desenvolvimento dos organismos aquáticos aparecem diferentes opções, como: utilizar sobras
130 de comida geradas pelos humanos na produção de rações Mo et al. (2018); uso de proteína de
131 soja (Davis e Arnold, 2000); uso de resíduos do processamento de carne e ossos de bovinos e
132 suínos (Forster et al., 2003); uso de carne de suíno (Hernández et al., 2008), uso de arroz
133 (Oujifard et al., 2015), macroalgas (Pallaoro et al., 2016) e microalgas (Macias-Sancho et al.,
134 2014). Os ingredientes alternativos devem ter alto teor protéico, ser rico em aminoácidos
135 essenciais, constar de alta digestibilidade, alta disponibilidade no mercado e não ser
136 economicamente inviável.

137 Buscando encontrar um ingrediente que possa ser utilizado como substituto do
138 composto principal das rações formuladas para a aquicultura, a microalga *Arthrospira*
139 *platensis* surge como candidata promissora devido a seu alto teor protéico (Gershwin e Belay,
140 2007), composição de ácidos graxos (Tokuşoglu e Ünal, 2003), efeitos imunoestimulantes
141 (Belay et al., 1996) e antioxidantes (Martínez-Palma et al., 2015). Além de apresentar
142 características nutricionais e efeitos positivos na saúde, também pode ser produzida
143 reaproveitando os nutrientes gerados pelos sistemas de produção aquícola (Chuntapa et al.,
144 2003).

145 História da *A. platensis*

146 A microalga *A. platensis* é conhecida desde a chegada dos europeus no México, onde
147 os Astecas coletavam para ser utilizada como suplemento na alimentação (Vonshak e
148 Richmond, 1988). Porém foi após a chegada do botânico Jean Leonard que essa informação
149 foi reportada para as tribos residentes nas redondezas das lagoas alcalinas do Chad e Niger
150 (Vonshak, 1997).

151 A cianobactéria destaca-se pela fonte de proteína unicelular e por suas propriedades
152 nutraceuticas (nutrientes mais farmacêuticos) (Colla et al., 2007), além de ser utilizada como
153 fonte de biocombustíveis (Pei et al., 2012). A natureza da sua composição é atrativa à
154 comercialização, sendo extraídos diferentes biocompostos como: biopigmentos, antioxidantes,
155 marcadores, enzimas, fármacos, exopolissacarídeos, vitaminas, proteínas, minerais, lipídios e
156 carboidratos (De Oliveira et al., 2013). Cabe ressaltar que também é constituída de
157 lipopolissacarídeos e ficocianina que estão associados a processos de imunestimulação
158 (Qureshi e Ali, 1996).

159 Características da *Arthrospira platensis*

160 A *Arthrospira platensis* é uma cianobactéria filamentosa, fotossintética, oxigênica e
161 com estrutura Gram-negativa (Okuyama et al., 2017). A mesma está formada por tricomas
162 helicoidais de tamanhos variados, cujas células variam no comprimento e largura de três a 12
163 µm. A organização celular é típica de uma célula procariótica sem os orgânulos unidos na
164 membrana celular (Gershwin e Belay, 2007).

165 Diferentes pesquisadores revelaram que a maior qualidade desse organismo é não
166 possuir parede celular, convertendo-a em alimento altamente digerível (Sasson, 1997). Em
167 adição, apresenta perfil nutritivo: Alto teor de proteína (>70% do peso seco), lipídios 7,0-16%
168 (Vonshak, 1997), pró-vitamina A (beta caroteno) (Ambrosi et al., 2009), ácido γ-linoléico
169 (Mahajan e Kamat, 1995; Wang et al., 2015), ficocianina (14% dos carotenóides) (Henrikson,
170 1989) e 17% de carboidratos (Gershwin e Belay, 2007). Os polissacarídeos extracelulares ou
171 exopolissacarídeos (EPS) podem ser facilmente extraídos e utilizados pela indústria
172 farmacêutica (De Oliveira et al., 2013).

173 Os avanços na tecnologia de produção convertem esta microalga em uma promissora
174 fonte de proteínas e compostos que auxiliaram na saúde humana e animal. Segundo Habib et
175 al. (2008), 30% da produção mundial de *A. platensis* é utilizada como alimento para animais.
176 Pesquisadores têm avaliado as vantagens da adição desta microalga em rações para peixes

177 (Nandeeshha et al., 1998; Nandeeshha et al., 2001; Watanuki et al., 2006; Dernekbası et al.,
178 2010; Ibrahim et al., 2013; Teimouri et al., 2013; Yeganeh et al., 2015; Adel et al., 2016) e
179 camarões (Cuzon et al., 1981; Bhavan et al., 2010; Macias-Sancho et al., 2014;
180 Radhakrishnan et al., 2014; Souza e Oliveira, 2015) em virtude dos resultados positivos no
181 desenvolvimento dos animais e efeito imunoestimulante nas diferentes espécies produzidas.

182 Além do uso como alimento na aquicultura, a microalga pode servir como subproduto
183 na produção de peixes ou camarões, uma vez que podem ser produzidas com as águas dos
184 efluentes dos cultivos. Durante os períodos de engorda de camarão as águas dos tanques
185 acumulam alta concentração de nitrogênio e fósforo inorgânico oriundos da fertilização com
186 rações comerciais, os quais servem como fonte de nutrientes para o desenvolvimento da *A.*
187 *platensis* (Sombatjinda et al., 2014). Chuntapa et al. (2003) obtiveram sucesso no cultivo
188 integrado do camarão tigre *Penaeus monodon* e *A. platensis*, a qual foi responsável por
189 consumir os compostos nitrogenados da unidade de produção e manter a qualidade da água.

190 Efeito na coloração

191 Uma das vantagens do uso de *A. Platensis* como parte do alimento de organismos
192 aquáticos é que estas são ricas em carotenóides (β - carotenóides) e ficobilinas (ficocianina)
193 (Gershwin e Belay, 2007). Estes são responsáveis por acentuar a coloração no músculo de
194 peixes e crustáceos e unicamente são produzidos por plantas, leveduras, algas e bactérias
195 (Ostermeyer et al., 2014). Por exemplo, o aumento de coloração em tons alaranjados no
196 músculo de camarões proporciona maior aceitação do produto por parte do mercado
197 consumidor (Parisenti et al., 2011). Como consequência desta melhoria na coloração
198 decorrentes destes carotenóides inclusos na dieta, vários estudos vêm sendo realizados com
199 diferentes espécies terrestres (Zahroojian et al., 2011; Holman & Malau-Aduli, 2013) e
200 aquícolas (James et al., 2006; Kalinowski et al., 2007; Güroy et al., 2012; Teimouri et al.,
201 2013).

202 Efeito imunestimulante

203 A microalga *A. platensis* tem alta eficiência como reguladora do sistema imune,
204 destacando-se as propriedades antiinflamatórias (Deng & Chow, 2010; Reverter et al., 2014;
205 Liu et al., 2015), hepatoprotetoras (Gad et al., 2011; Jamil et al., 2015; Sharoud, 2015),
206 neuroprotetoras (Thaakur & Sravanthi, 2010), imunestimulantes (Belay et al., 1996; Lin et al.,
207 2010; Macias-Sancho et al., 2014) e efeitos na microbiota do trato intestinal devido à presença

208 de lipopolissacarídeos (Okuyama et al., 2017). Os lipopolissacarídeos ligados ao composto
209 lipídico A, oriundos da microalga, demonstraram atividade antitumoral, tendo efeito imune
210 regulador das células tumorais (Okuyama et al., 2017).

211 O processo de apoptose é a resposta celular às infecções virais, cuja função é prevenir
212 a regeneração e disseminação das viroses (Shih et al., 2003). Diferentes pesquisas indicam
213 que os produtos da *A. platensis* são o armamento humoral e celular do sistema imune (Khan et
214 al., 2005). Efeitos na resposta apóptica foram descritas em ratos (Chu et al., 2010), moluscos
215 (Sunila e LaBanca, 2003) e camarões que utilizaram a microalga como alimento (Macias-
216 Sancho et al., 2014).

217 Efeito antioxidante

218 Segundo Miranda et al. (1998), os extratos de *Spirulina*, compostos fenólicos
219 clorogênicos e ácidos atuam eficientemente como antioxidantes. Esses compostos são
220 importantes para o funcionamento da enzima super-óxido dismutase, que simultaneamente é a
221 fonte mais importante de espécies reativas de oxigênio (ROS) no corpo dos animais. Esta
222 enzima se encontra associada à processos degenerativos e auxilia na resistência de doenças,
223 envelhecimento de peixes, camarões e outros organismos aquáticos (Pmaulapathy, 2013). Os
224 radicais livres decorrentes da poluição, deficiência alimentar, lesões ou episódios de estresse
225 são eliminados pelos compostos inerentes na *A. platensis*.

226 HIPÓTESES

227 O cultivo integrado de microalga *Arthrospira platensis* e camarão branco *Litopenaeus*
228 *vannamei* durante as fases de berçário e engorda beneficiará o desenvolvimento e a
229 sobrevivência do camarão branco.

230 A substituição da farinha de peixe por farinha de *Arthrospira platensis* e a inclusão de
231 metionina cristalina nas dietas de *Litopenaeus vannamei* favorecerá o desenvolvimento,
232 sobrevivência, coloração, sistema imunológico e peroxidação lipídica do camarão branco.

233 A alimentação do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* com dietas com
234 alto conteúdo de *Arthrospira platensis* regulará a aparição de diferentes tipos de bactérias no
235 trato digestivo de camarão branco devido à natureza prébiótica da microalga.

236 Com o intuito de confirmar as hipóteses anteriores foram realizados experimentos com
237 diferentes objetivos tais como:

238 OBJETIVOS

239 OBJETIVOS GERAIS

240 Introduzir a microalga *Arthrospira platensis* em sistemas de produção superintensivos
241 de camarão *Litopenaeus vannamei* durante a fase de berçário.

242 Avaliar a inclusão da *Arthrospira platensis* viva em um sistema superintensivo de
243 produção de camarão branco.

244 Substituir as rações com altos níveis de substituição de farinha de peixe por farinha de
245 microalga *Arthrospira platensis* mediante a adição de metionina cristalina.

246 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

247 Enriquecer os conglomerados de bactérias originados nos tanques de produção de
248 berçário de *Litopenaeus vannamei* pela adição de microalga em pó e viva e avaliar os efeitos
249 no desempenho e sobrevivência dos camarões.

250 Avaliar a retirada de compostos nitrogenados em sistema de produção intensivo de
251 camarão branco na fase de engorda utilizando a microalga *Arthrospira platensis* em cocultivo
252 com *Litopenaeus vannamei*.

253 Formular rações com altos níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de
254 microalga *Arthrospira platensis* com inclusão de metionina cristalina para alimentação de
255 camarão *Litopenaeus vannamei*.

256 Determinar os efeitos na população microbiana dos intestinos de camarão branco
257 através de análises histológicas.

258 Avaliar a coloração do camarão branco do Pacífico.

259 Determinar o conteúdo total de carotenóides nas dietas e no músculo do camarão
260 branco.

261 Analisar efeitos imunológicos no camarão branco mediante análises de proteína na
262 hemolinfa, contagem de hemócitos totais e apoptoses.

263 Avaliar os efeitos de dietas com altos níveis de *A. platensis* na peroxidação lipídica do
264 músculo e hepatopancreas do *Litopenaeus vannamei*.

265 REFERÊNCIAS

- 266 Adel M, Yeganeh S, Dadar M, Sakai M, Dawood MA (2016) Effects of dietary *Spirulina*
267 *platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease
268 resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish & shellfish*
269 *immunology*, 56, 436-444.
- 270 Ambrosi MA, Reinehr CO, Bertolin TE, Costa JAV, Colla LM (2009) Propriedades de saúde
271 de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29, 109-117.
- 272 Belay A, Kato T, Ota Y (1996) *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal
273 feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8, 303-311.
- 274 Bhavan P, Devi V, Shanti R, Radhakrishnan S, Poongodi R (2010) Basic biochemical
275 constituents and profiles of amino acids in the post larvae of *Macrobrachium*
276 *rosenbergii* fed with *Spirulina* and Yeast enriched *Artemia*. *Journal of Scientific*
277 *Research*, 2, 539.
- 278 Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L,
279 Handisyde N, Gatward I (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philosophical*
280 *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 2897-2912.
- 281 Chu W-L, Lim Y-W, Radhakrishnan AK, Lim P-E (2010) Protective effect of aqueous extract
282 from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC*
283 *complementary and alternative medicine*, 10, 53.
- 284 Chuntapa B, Powtongsook S, Menasveta P (2003) Water quality control using *Spirulina*
285 *platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220, 355-366.
- 286 Colla LM, Reinehr CO, Reichert C, Costa JAV (2007) Production of biomass and
287 nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and
288 nitrogen regimes. *Bioresource technology*, 98, 1489-1493.
- 289 Cuzon G, Santos RD, Hew M, Poullaouec G (1981) Use of *Spirulina* in Shrimp (*Penaeus*
290 *japonicus*) diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, 12, 282-291.
- 291 Davis DA, Arnold C (2000) Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white
292 shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 185, 291-298.
- 293 De la LLave C (2018) [http://www.panorama.com.ve/mundo/La-acuicultura-crece-](http://www.panorama.com.ve/mundo/La-acuicultura-crece-rapidamente-como-una-solucion-al-problema-alimenticio-mundial-20180126-0013.html)
294 [rapidamente-como-una-solucion-al-problema-alimenticio-mundial-20180126-](http://www.panorama.com.ve/mundo/La-acuicultura-crece-rapidamente-como-una-solucion-al-problema-alimenticio-mundial-20180126-0013.html)
295 [0013.html](http://www.panorama.com.ve/mundo/La-acuicultura-crece-rapidamente-como-una-solucion-al-problema-alimenticio-mundial-20180126-0013.html).

296 De Oliveira CA, de Oliveira Campos AA, Ribeiro SMR, de Castro Oliveira W, do
297 Nascimento AG (2013) Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria
298 spirulina. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN*, 5, 52-59.

299 Deng R, Chow TJ (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of
300 microalgae Spirulina. *Cardiovascular therapeutics*, 28.

301 Dernekbasi S, Unal H, Karayucel I, Aral O (2010) Effect of dietary supplementation of
302 different rates of spirulina (*Spirulina platensis*) on growth and feed conversion in
303 Guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1860). *Journal of Animal and Veterinary Advances*,
304 9, 1395-1399.

305 Dinesh D , (Ed). 2016. Agricultural practices and technologies to enhance food security,
306 resilience and productivity in a sustainable manner: Messages for SBSTA 44
307 agriculture workshops. CCAFS Working Paper no. 146. CGIAR Research Program on
308 Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). Copenhagen, Denmark.
309 Disponível em: www.ccafs.cgiar.org

310 Edwards P (2015) Aquaculture environment interactions: past, present and likely future
311 trends. *Aquaculture*, 447, 2-14.

312 Forster I, Dominy W, Obaldo L, Tacon A (2003) Rendered meat and bone meals as
313 ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*,
314 219, 655-670.

315 Froehlich HE, Gentry RR, Halpern BS (2017) Conservation aquaculture: Shifting the
316 narrative and paradigm of aquaculture's role in resource management. *Biological
317 Conservation*, 215, 162-168.

318 Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA
319 (2011) Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina
320 in rats. *Nutrition*, 27, 582-589.

321 Gershwin ME, Belay A (2007) *Spirulina in human nutrition and health*, CRC press.

322 Glencross B, Booth M, Allan G (2007) A feed is only as good as its ingredients—a review of
323 ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*, 13, 17-
324 34.

325 Güroy B, Şahin İ, Mantoğlu S, Kayalı S (2012) Spirulina as a natural carotenoid source on
326 growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid
327 *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International*, 20, 869-878.

328 Gwinn DC, Allen MS, Johnston FD, Brown P, Todd CR, Arlinghaus R (2015) Rethinking
329 length-based fisheries regulations: the value of protecting old and large fish with
330 harvest slots. *Fish and Fisheries*, 16, 259-281.

331 Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR (2008) A review on culture, production
332 and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *Food*
333 *and agriculture organization of the united nations*.

334 Hall S, Schaffer A (2015) Fishing for a future. Disponivel em:
335 [http://www.fishingfuture.org/fileadmin/redaktion/PDF/FFF-02-](http://www.fishingfuture.org/fileadmin/redaktion/PDF/FFF-02-15_LondonPaper_web_RZ.pdf)
336 [15_LondonPaper_web_RZ.pdf](http://www.fishingfuture.org/fileadmin/redaktion/PDF/FFF-02-15_LondonPaper_web_RZ.pdf)

337 Henrikson R (1989) Earth food spirulina. *Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc*, 187.

338 Hernández C, Olvera-Novoa MA, Aguilar-Vejar K, González-Rodríguez B, de la Parra IA
339 (2008) Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for
340 Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 277, 244-250.

341 Holman B, Malau-Aduli A (2013) Spirulina as a livestock supplement and animal feed.
342 *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97, 615-623.

343 Ibrahim MD, Mohamed MF, Ibrahim MA (2013) The role of Spirulina platensis (*Arthrospira*
344 *platensis*) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its
345 resistance to bacterial infection. *Journal of Agricultural Science*, 5, 109.

346 James R, Sampath K, Thangarathinam R, Vasudevan I (2006) Effect of dietary spirulina level
347 on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus*
348 *helleri*. *The Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgeh*, 58, 97–104.

349 Jamil ABM, Akanda M, Rahman M, Hossain M, Islam M (2015) Prebiotic competence of
350 spirulina on the production performance of broiler chickens. *Journal of Advanced*
351 *Veterinary and Animal Research*, 2, 304.

352 Kalinowski CT, Izquierdo MS, Schuchardt D, Robaina LE (2007) Dietary supplementation
353 time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid
354 concentration. *Aquaculture*, 272, 451-457.

355 Khan Z, Bhadouria P, Bisen P (2005) Nutritional and therapeutic potential of Spirulina.
356 *Current pharmaceutical biotechnology*, 6, 373-379.

357 Lin Y-C, Tayag CM, Huang C-L, Tsui W-C, Chen J-C (2010) White shrimp *Litopenaeus*
358 *vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier
359 recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish &*
360 *shellfish immunology*, 29, 1092-1098.

361 Liu Y-J, Du J-L, Cao L-P, Jia R, Shen Y-J, Zhao C-Y, Xu P, Yin G-J (2015) Anti-
362 inflammatory and hepatoprotective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on
363 carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*
364 L.). *International immunopharmacology*, 25, 112-120.

365 Macias-Sancho J, Poersch LH, Bauer W, Romano LA, Wasielesky W, Tesser MB (2014)
366 Fishmeal substitution with Arthrospira (*Spirulina platensis*) in a practical diet for
367 *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters.
368 *Aquaculture*, 426-427, 120-125.

369 Mahajan G, Kamat M (1995) γ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Applied*
370 *Microbiology and Biotechnology*, 43, 466-469.

371 Martínez-Palma N, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G (2015) Determinación de actividad
372 antioxidante y quelante de hidrolizados proteicos de espirulina (*Arthrospira maxima*)
373 obtenidos por simulación de digestión gastrointestinal. *Revista mexicana de ingeniería*
374 *química*, 14, 25-34.

375 Meyers SP (2000) Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas.
376 *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de*
377 *Nutrición Acuícola, La Paz, BCS, México*, 473-491.

378 Miranda M, Cintra R, Barros S, Mancini-Filho J (1998) Antioxidant activity of the microalga
379 *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 31, 1075-
380 1079.

381 Mo WY, Man YB, Wong MH (2018) Use of food waste, fish waste and food processing
382 waste for China's aquaculture industry: Needs and challenge. *Science of the Total*
383 *Environment*, 613, 635-643.

384 Nandeesh M, Gangadhar B, Varghese T, Keshavanath P (1998) Effect of feeding *Spirulina*
385 *platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common
386 carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 29, 305-312.

387 Nandeesh M, Gangadhara B, Manissery J, Venkataraman L (2001) Growth performance of
388 two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets
389 containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 80, 117-
390 120.

391 Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM,
392 Goldberg RJ, Hua K (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources.
393 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 15103-15110.

394 Okuyama H, Tominaga A, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Ono S (2017) Spirulina
395 lipopolysaccharides inhibit tumor growth in a Toll-like receptor 4-dependent manner
396 by altering the cytokine milieu from interleukin-17/interleukin-23 to interferon- γ .
397 *Oncology reports*, 37, 684-694.

398 Ostermeyer U, Molкетин J, Lehmann I, Rehbein H, Walte H-G (2014) Suitability of
399 instrumental analysis for the discrimination between wild-caught and conventionally
400 and organically farmed shrimps. *European Food Research and Technology*, 239,
401 1015-1029.

402 Oujifard A, Seyfabadi J, Abedian Kenari A, Rezaei M (2015) Growth response and tail-
403 muscle fatty acid quality of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed
404 with diets containing different levels of rice protein concentrate. *Iranian Journal of*
405 *Fisheries Sciences*, 14, 188-200.

406 Pallaoro MF, do Nascimento Vieira F, Hayashi L (2016) *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales)
407 as co-feed for Pacific white shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3659-3665.

408 Parisenti J, Beirão LH, Tramonte VLCCG, Ourique F, da Silveira Brito CC, Moreira CC (2011)
409 Preference ranking of colour in raw and cooked shrimps. *International Journal of*
410 *Food Science & Technology*, 46, 2558-2561.

411 Patrick WS, Link JS (2015) Myths that Continue to Impede Progress in Ecosystem-Based
412 Fisheries Management. *Fisheries*, 40, 155-160.

413 Pmaulapathy SV (2013) The multifunctional dietary proprieties of Spirulina and its use in
414 Aquaculture. *International Aquafeed*. March- April, 68, 34-36.
415 https://issuu.com/international_aquafeed/docs/iaf1301_w1

416 Pei X, Yuan X, Zeng G, Huang H, Wang J, Li H, Zhu H (2012) Co-liquefaction of microalgae
417 and synthetic polymer mixture in sub- and supercritical ethanol. *Fuel Processing*
418 *Technology*, 93, 35-44.

419 Qureshi M, Ali R (1996) *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic
420 function in cats. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 18, 457-463.

421 Radhakrishnan S, Bhavan PS, Seenivasan C, Shanthi R, Muralisankar T (2014) Replacement
422 of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-
423 enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *The*
424 *Journal of Basic & Applied Zoology*, 67, 25-33.

- 425 Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish
426 aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives.
427 *Aquaculture*, 433, 50-61.
- 428 Sasson A (1997) Cultivation of Spirulina. *Microalgal biotechnologies: recent developments*
429 *and prospects for developing countries*, 11-31.
- 430 Sharoud MN (2015) Protective effect of spirulina against paracetamol-induced hepatic injury
431 in rats. *J. Exp. Biol. Agric. Sci*, 3, 44-53.
- 432 Shih SR, Tsai KN, Li YS, Chueh CC, Chan EC (2003) Inhibition of enterovirus 71-induced
433 apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *spirulina platensis*.
434 *Journal of Medical Virology*, 70, 119-125.
- 435 Sombatjinda S, Wantawin C, Techkarnjanaruk S, Withyachumnarnkul B,
436 Ruengjitchatchawalya M (2014) Water quality control in a closed re-circulating
437 system of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae co-cultured with
438 immobilized Spirulina mat. *Aquaculture international*, 22, 1181-1195.
- 439 Souza I, Oliveira P (2015) Utilização da cianobactéria *Spirulina maxima* e da levedura
440 *Saccharomyces cerevisiae* como dietas complementares no cultivo de *Artemia*
441 *franciscana*/Use the cyanobacterium *Spirulina maxima* and yeast *Saccharomyces*
442 *cerevisiae* as further in diets for cultivation of *Artemia franciscana*. *Holos*, 31, 54.
- 443 Sunila I, LaBanca J (2003) Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern
444 oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of aquatic organisms*, 56, 163-170.
- 445 Tacon AG, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in
446 industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285,
447 146-158.
- 448 Tacon AG, Metian M (2015) Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture.
449 *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23, 1-10.
- 450 Teimouri M, Amirkolaie AK, Yeganeh S (2013) The effects of dietary supplement of
451 *Spirulina platensis* on blood carotenoid concentration and fillet color stability in
452 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 414, 224-228.
- 453 Thaakur S, Sravanthi R (2010) Neuroprotective effect of Spirulina in cerebral ischemia-
454 reperfusion injury in rats. *J Neural Transm (Vienna)*, 117, 1083-1091.
- 455 Tokuşoglu Ö, Ünal M (2003) Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina*
456 *platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of food science*, 68, 1144-1148.

- 457 Vonshak A (1997) *Spirulina platensis arthrospira*: physiology, cell-biology and
458 biotechnology, CRC Press.
- 459 Vonshak A, Richmond A (1988) Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an
460 overview. *Biomass*, 15, 233-247.
- 461 Wang F, Miao M, Chen B, Wang R, Sun B, Ren D, Lu J (2015) Antineoplastic activity of γ -
462 linolenic acid extract from *Spirulina platensis* on HepG2 cells and its inhibition effect
463 on platelet aggregation. *Food and agricultural immunology*, 26, 97-108.
- 464 Watanuki H, Ota K, Tassakka ACMA, Kato T, Sakai M (2006) Immunostimulant effects of
465 dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258, 157-163.
- 466 Yeganeh S, Teimouri M, Amirkolaie AK (2015) Dietary effects of *Spirulina platensis* on
467 hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus*
468 *mykiss*). *Research in veterinary science*, 101, 84-88.
- 469 Zahroojian N, Moravej H, Shivazad M (2011) Comparison of marine algae (*Spirulina*
470 *platensis*) and synthetic pigment in enhancing egg yolk colour of laying hens. *British*
471 *poultry science*, 52, 584-588.

472

CAPÍTULO 1

473 Diferentes aplicações da microalga *Arthrospira platensis* no período de berçário do camarão
474 marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema bioflocos: Efeitos no desempenho e sobrevivência.

475 **Formatado para a submissão em revista: Boletim do Instituto da pesca**

476 RESUMO

477 A produção de camarões marinhos nos últimos anos vem se aperfeiçoando introduzindo novas
478 ferramentas que melhoram a produtividade. Otimizar o crescimento dos crustáceos mediante a
479 super intensificação das fases de berçário utilizando o sistema de bioflocos permite aumentar
480 as taxas de crescimento e de sobrevivência ao final dos ciclos de produção. As características
481 da cianobactéria *Arthrospira platensis* possibilitam o incremento de resposta do sistema
482 imunológico do camarão branco do Pacífico. Para confirmar que a microalga viva ou em pó
483 pode se integrar no sistema de produção em bioflocos foram distribuídos aleatoriamente 1350
484 pós larvas de camarão (0,25g) em três tratamentos com triplicata em densidade de cultivo de
485 4000 camarões/m². Os tratamentos foram divididos: sistema bioflocos (T1); sistema bioflocos +
486 pó de *Arthrospira platensis* (T2) e sistema bioflocos + *Arthrospira platensis* viva. Foram
487 avaliados os parâmetros de crescimento, sobrevivência, composição proximal dos camarões e
488 composição proximal dos bioflocos. No final do período experimental se obtiveram melhores
489 resultados de sobrevivência nos tratamentos onde a microalga foi adicionada revelando maior
490 poder imunoestimulante dos bioflocos que contêm compostos da microalga *A. platensis*.

491 *Palavras chave: cianobactéria, enriquecimento, intensificação, sobrevivência.*

492 INTRODUÇÃO

493 A intensificação dos sistemas de produção de camarão tem sido possível devido às
494 novas técnicas e as melhorias no manejo das fazendas. O sistema de produção em bioflocos
495 inclui uma série de microrganismos procedentes do próprio sistema, os quais servem de
496 alimento para os camarões (WASIELESKY *et al.*, 2006). Através da aplicação de fontes de
497 carbono orgânico para aumentar a relação carbono- nitrogênio (C: N) é possível remover os
498 compostos de nitrogênio inorgânico formados no sistema de produção (SUITA *et al.*, 2015).

499 Os bioflocos são compostos formados por bactérias aeróbicas e heterotróficas,
500 protozoários, microalgas, metazoários, exoesqueletos, fezes e sobras de organismos mortos
501 (DE SCHRYVER *et al.*, 2008). Esses constituintes, além de formarem parte da dieta dos
502 camarões (WASIELESKY *et al.*, 2006) são capazes retirar o excesso de nutrientes
503 acumulados nos tanques (BURFORD *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2014; EBELING *et al.*, 2006).
504 Enriquecer os bioflocos incluindo microalgas no tanque de criação poderá elevar o valor

505 nutritivo dos mesmos, aumentando o nível de proteína, além do valor imunoestimulante. A
506 *Arthrospira platensis* é uma microalga promissora para ser utilizada na aquicultura por ter
507 elevado teor de proteína e efeitos imunoestimulantes (BELAY *et al.*, 1996). Em adição, têm a
508 capacidade de retirar os compostos nitrogenados, fosfatados e metais pesados das água
509 residuais (CAI *et al.*, 2013).

510 A microalga *A. platensis* contém alto teor de proteínas (>70% do peso seco), lipídios 7-
511 16% (VONSHAK, 1997), pró-vitamina A (β - carotenos) (AMBROSI *et al.*, 2009), ficocianina
512 (14% dos carotenoides) (HENRIKSON, 1989), 17% de carboidratos (GERSHWIN e BELAY,
513 2007) e ácidos graxos do tipo γ -linoleico (GLA) (MAHAJAN E KAMAT, 1995; WANG *et*
514 *al.*, 2015). Essas características aportam a essa microalga propriedades tais como: eficiência
515 antiinflamatória (DENG e CHOW, 2010; LIU *et al.*, 2015; REVERTER *et al.*, 2014),
516 hepatoprotetoras (GAD *et al.*, 2011; SHAROUD, 2015) e imunoestimulantes (BELAY *et al.*,
517 1996; LIN *et al.*, 2010; MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014). Essas particularidades juntamente
518 com o alto nível de digestibilidade, propiciaram a integração de *A. platensis* em pó e da forma
519 viva nos bioflocos.

520 As microalgas destacam-se por serem um dos componentes da dieta pós- larvas de
521 camarão marinho (MULLER-FEUGA, 2000). As mesmas atuam como suporte alimentar e
522 como mecanismo regulador de compostos limitantes.

523 Através do presente experimento objetiva-se conferir o nível de estabelecimento da
524 microalga nos conglomerados de bioflocos e avaliar o crescimento e sobrevivência dos
525 camarões cultivados em sistema de bioflocos com diferentes aportes de *A. platensis*.

526 MATERIAL E MÉTODOS

527 Náuplios de camarão branco *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) da empresa
528 Aquatec (RN), Brasil, foram recebidos pelo laboratório de larvicultura de camarões marinhos
529 da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brasil. Durante o período de
530 larvicultura, as larvas foram mantidas em tanques com volume de 10 mil litros, com
531 temperatura de 29 °C e com oxigenação constante para permitir a evolução pelos estágios
532 larvais até atingir o peso de 0,25 g, para o começo do experimento. Foi realizado o aporte de
533 melaço (relação carbono: nitrogênio de 6: 1) para iniciar a formação de bioflocos no sistema
534 de produção como descrito por Avnimelech (2009). Isso permitiu controlar os compostos
535 nitrogenados devido ao crescimento de bactérias heterotróficas.

536 O experimento estava composto por três tratamentos de três caixas de poliuretano
537 transparentes de volume útil de 35 litros e área de 0,2 m². Quando os camarões atingiram a
538 idade de pós- larva 21, foram separados 1500 indivíduos aleatoriamente. Posteriormente se
539 estacoram 150 indivíduos por caixa com peso médio de 0,24 g cada (4285 camarões/m³).

540 Os três tratamentos foram definidos como: Tratamento 1 (T1): sistema de biofloco
541 convencional, Tratamento 2 (T2): sistema de bioflocos enriquecido com pó de microalga *A.*
542 *platensis* (5,0 gramas diárias) durante 28 dias antes do começo do experimento; Tratamento 3
543 (T3): sistema de bioflocos mais o inóculo diário de microalga *A. platensis* viva (500 ml com
544 densidade de cultivo de 10⁴ células por ml). Foi realizada a inoculação de bioflocos
545 provenientes de cultivos anteriores como sugerido por KRUMMENAUER *et al.* (2013) para
546 reduzir o tempo de crescimento da comunidade bacteriana.

547 Durante o experimento foi utilizada ração 40J Guabi® (Brasil) (1,6 mm). A microalga
548 em pó administrada no T2 foi cedida pela fazenda Tamanduá (Paraíba), Brasil. A cepa de *A.*
549 *platensis* foi obtida do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio
550 Grande (LEB-FURG). Essa microalga utilizada no T3 foi cultivada em tanques cilíndricos
551 com 250 L de volume útil, em meio f/2, modificado de GUILLARD (1975) na Estação
552 Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande (EMA/FURG) . O meio de
553 cultivo da microalga estava composto por água marinha filtrada em filtro CUNO® e tratada
554 com 0,15 ml/L de hipoclorito de sódio a 5,0% e neutralizada com 0,04 g/L de ácido ascórbico.

555 A solução do estoque de cultivo estava formada por uma mistura de 150 g/L de
556 NaNO₃, 8,0 g/L de FeCl₃, 9,0 g/L de Na₂EDTA, 1,0 ml/L de solução de metais (5,0 mg/L de
557 CoCl₂; 9,0 mg/L de ZnCl₂; 100 mg/L de MnCl₂; 6,0 mg/L de CuSO₄ e 3,0 mg/L de (NH₄)₆
558 Mo₇O₂₄) e mais uma solução de fosfato (9,0 g/L de Na₂HPO₄ e 1g/L de vitamina B₁₂). Dessa
559 solução estoque utilizou-se 1,0 ml/L de cada solução para preparo do meio de cultivo.
560 Salienta-se que os cultivos eram mantidos em salinidade 30, pH 8,0, temperatura de 30°C,
561 intensidade luminosa de 1500 lux, fotoperíodo de 24h por dia de luz e com aeração constante.

562 A composição centesimal da ração e da microalga *A. platensis* em suas diferentes
563 apresentações foi analisada de acordo com a metodologia proposta por HORWITZ e
564 LATIMER (2000) no laboratório de nutrição de organismos aquáticos (LANOA) da FURG.

565 Tabela 1: Composição proximal das fontes de alimento utilizadas durante 16 dias, (n=5)

	Ração	Pó de <i>A. platensis</i>	<i>A. platensis</i> viva
Proteína (%)	39,8 ± 0,35	51,00 ± 1,97	65,3±0,24

Lipídios (%)	9,13 ± 0,04	0,46 ± 0,11	2,92±0,95
Umidade (%)	6,28 ± 0,02	6,20 ± 0,05	88,48±0,05
Cinzas (%)	12,11± 0,59	2,78 ± 0,24	4,97±0,21

566 *Parâmetros da qualidade da água*

567 Foi utilizada água marinha com salinidade 30, previamente filtrada em filtros de 25,
568 5,0 e 1,0 µm, clorada com hipoclorito de sódio a 15 ppm e tratada com ácido ascórbico (1,0
569 ppm). Posteriormente, a mesma foi tratada com EDTA (20 ppm). Esta água foi mantida
570 aquecida à 27 °C em reservatório de água de 1000 L para posterior utilização nas renovações
571 diárias de água do sistema.

572 A salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram mensurados duas vezes ao
573 dia com uso de sonda multiparâmetros YSI® modelo 556. Amônia, nitrito, nitrato e fosfato
574 foram verificados de acordo com a metodologia descrita por UNESCO (1983),
575 BENDSCHNEIDER e ROBINSON, 1952), e AMINOT e CHAUSSEPIED, 1983).

576 A amônia foi medida diariamente. O nitrito, nitrato e fosfato foram medidos três vezes
577 por semana durante os 16 dias de experimento. A alcalinidade foi mensurada três vezes por
578 semana pela metodologia da (STANDARD, 2002) e, quando necessário, ajustada para
579 concentrações acima de 100 mg/L de CaCO₃ de acordo com recomendações de FURTADO *et*
580 *al.* (2011) .O fotoperíodo utilizado foi de 12 horas claro e 12 horas escuro. A cada dois dias
581 foram realizadas reposições do volume de água perdida por evaporação.

582 A concentração de sólidos totais dos diferentes tanques foi realizada de acordo com os
583 padrões descritos por GAONA *et al.* (2011), Amostras de 20 ml de água homogênea eram
584 passadas por filtros de microporo de 0,02 µm usando uma bomba à vácuo. Na seqüência os
585 filtros eram colocados por quatro horas na estufa a 50 °C e pesados para estimar a
586 concentração de sólidos totais por litro de água no tanque de cultivo.

587 *Indicadores de Desenvolvimento dos Camarões*

588 Para avaliar o desempenho zootécnico dos camarões, foram examinados os seguintes
589 parâmetros: Ganho em peso = (peso final- peso inicial); Sobrevivência (%) = [100 x (número
590 final de camarões/número inicial de camarões)].

591 Um total de 10 indivíduos por unidade experimental foi coletado ao final do
592 experimento para análise de composição proximal do músculo. Essa análise foi realizada no
593 Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) da FURG, onde a obtenção de

594 parâmetros de concentração de proteínas, extrato etéreo, cinzas e umidade da composição de
595 músculo do camarão branco seguiram protocolos descritos por HORWITZ e LATIMER
596 (2000).

597 *Composição proximal dos bioflocos*

598 No final do experimento foram coletadas amostras de água de cada unidade
599 experimental e filtradas por filtros de 0,2 µm para obter 50 gramas de bioflocos para
600 determinar a composição proximal do material acumulado durante o processo de produção.
601 Essas análises foram realizadas no LANOA da FURG, de acordo com o HORWITZ e
602 LATIMER (2000) visando aferir os valores de proteína, lipídios, umidade e cinzas.

603 *Análises estatísticas*

604 O delineamento experimental foi aleatório e estava formado por três tratamentos com
605 três réplicas cada. Análises de variância de uma via (ANOVA) foram utilizadas para verificar
606 o efeito da microalga aplicada em pó ou viva sobre o desenvolvimento e sobrevivência dos
607 camarões, após serem atendidas as premissas de normalidade pelo teste de Kolmogorov-
608 Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Posteriormente foi aplicado o teste de
609 Newman-Keuls para avaliar se havia diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

610 RESULTADOS

611 *Parâmetros físico-químicos da água*

612 A salinidade foi mantida em 30, a temperatura média foi de 28,5 °C, a concentração
613 média de oxigênio dissolvido foi 4,8 mg/L e o pH médio de 7,85 para os tratamentos. Os
614 valores de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito, nitrato e fosfato estão
615 expressados na Tabela 2. Os valores de oxigênio dissolvido total, amônia e alcalinidade
616 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo e
617 estão apresentados na Tabela 2. Os valores de amônia ao longo do experimento estão
618 indicados na Figura 1.

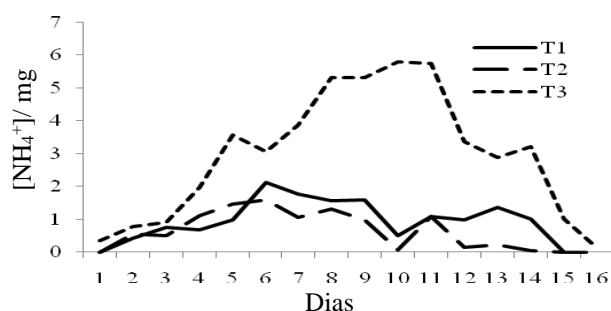
619 Tabela 2. Resultados dos parâmetros de qualidade da água ao longo do período experimental.
620 T1: tratamento com bioflocos convencional; T2: tratamento com bioflocos enriquecido com pó
621 de microalga *A. platensis*; T3: tratamento com bioflocos enriquecido com *A. platensis* viva.

	T1	T2	T3
T (°C)	28,54± 0,53 a	28,49± 0,65 a	28,54± 0,52 a
O.D,	5,72±1,73 ab	5,67± 0,39 b	7,57± 1,55 a
pH	7,86± 0,13 a	7,88± 0,11 a	8,00± 0,13 a
NH ₄ ⁺	0,91± 1,04 a	0,63± 0,86 a	2,95± 2,11 a
NO ₂ ⁻	8,60± 7,3 a	9,29± 8,29 a	3,69± 5,17 a
NO ₃	9,15±4,85 a	8,79±3,82 a	7,37± 2,95 a
PO ₄	0,34±0,23 a	0,47± 0,22 a	0,32± 0,25 a
Alcalinidade	186,43± 25,32 a	208,09 ± 40,66 a	261,19±58,68 b
Sólidos	655,83± 477	727,36± 580	619,17± 414

622 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p< 0,05)

623 Temperatura T (°C); Concentração de oxigênio dissolvido na água (O.D) (mg O₂/ l H₂O); pH;
624 concentração de amônia na água NH₄ (mg NH₄/ l H₂O); concentração de nitrito na água NO₂
625 (mg NO₂ / l H₂O concentração de nitrato na água NO₃ (mg NO₃/ l H₂O); concentração de
626 fosfato na água PO₄ (mg PO₃/ l H₂O); alcalinidade (mg de Ca Mg CO₃/ l H₂O); Sólidos:
627 concentração de sólidos suspensos totais na água.

628 Figura1. Concentração de amônia ao longo do experimento. T1(—): tratamento com
629 bioflocos convencionais; T2(— —): tratamento com bioflocos enriquecidos com pó de
630 microalga *A. platensis*; T3 (— —): tratamento com bioflocos enriquecidos com *A. platensis* viva.



631

632 Resultados de crescimento e sobrevivência

633 No final do período experimental pesagens individuais e contagens dos organismos de
634 cada unidade experimental foram realizadas para obter os resultados de peso final e
635 sobrevivência para cada tratamento. Esses resultados estão expressos na Tabela 3.

Foram determinadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para percentagem de sobrevivência, resultando maior para os tratamentos que incluíam algumas das formas empregadas de *A. platensis* nos tanques.

636 Tabela 3: Parâmetros zootécnicos ao final do experimento. T1: tratamento com bioflocos
637 convencional; T2: tratamento com bioflocos enriquecido com pó de microalga *A. platensis*; T3:
638 tratamento com bioflocos enriquecido com *A. platensis* viva.
639 Os dados estão representados por média e desvio padrão ($n > 5$).

	T1	T2	T3
PI (g)	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,03
PF (g)	0,60 ± 0,25	0,55 ± 0,31	0,52 ± 0,22
TCE (%)	4,38 ± 0,85	4,95 ± 1,81	4,41 ± 0,71
SB (%)	63,77 ± 6,3 b	77,86 ± 4,2 a	75,09 ± 1,4 a

640 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
641 Peso inicial (PI), Peso final em gramas (PF), Taxa de crescimento específico, Sobrevivência
642 em % (SB).

643 *Composição proximal dos bioflocos e camarões*

644 Os resultados presentes na Tabela 4 demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) no
645 conteúdo de proteína, sendo maiores as concentrações de proteína nos bioflocos obtidos
646 mediante a aplicação de microalga *A. platensis* viva.

647 No final da fase experimental, foram coletados 10 camarões por unidade experimental
648 para realizar as análises de composição proximal. A deposição de proteína acumulada nos
649 camarões em sistema de bioflocos enriquecido com algumas formas de aplicação da *A.*
650 *platensis* foram maiores significativamente ($p < 0,05$) que para os camarões cultivados em
651 sistema de bioflocos convencional. Contrariamente, os dados de deposição de lipídios
652 demonstraram menor acumulação para os camarões nos tratamentos onde a microalga
653 formava parte do sistema de produção. As composições proximais dos bioflocos de cada
654 tratamento apresentaram diferenças estatísticas nas concentrações de proteína, sendo maiores
655 para o tratamento onde foi administrada a cianobactéria na forma viva que para o tratamento
656 sem suplementação. Contrariamente, os dados de concentração de cinzas foram maiores no
657 caso onde o bioflocos não recebeu nenhum tipo de suplemento. Os dados estão apresentados na
658 Tabela 4.

659 Tabela 4: Composição proximal dos camarões e dos bioflocos para os diferentes tratamentos.
 660 T1: tratamento com bioflocos convencional; T2: tratamento com bioflocos enriquecidos com pó
 661 de microalga *A. platensis*. T3: tratamento com bioflocos enriquecidos com *A. platensis* viva. Os
 662 resultados estão expressos como média e desvio padrão (n=10).

Músculo	T1	T2	T3
Proteína (%)	20,28± 0,12 b	20,52± 0,20 b	22,09± 0,19 a
Lipídios (%)	0,18± 0,02 a	0,10± 0,02 b	0,11± 0,01 b
Umidade (%)	72,53± 0,51	72,79± 0,84	74,63± 0,04
Cinzas (%)	1,83± 0,29	1,78 ± 0,14	1,75±0,21
Floco	T1	T2	T3
Proteína (%)	25,17± 2,02 b	28,91± 2,21 ab	33,85± 3,07 a
Lipídios (%)	0,09± 0,01	0,10± 0,02	0,10± 0,01
Umidade (%)	72,72± 0,65	72,67± 0,33	72,66± 0,78
Cinzas (%)	8,63± 0,17 b	8,45 ± 0,33 b	5,87± 0,45 a

663 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p< 0,05)

664 DISCUSSÃO

665 Os resultados de sobrevivência obtidos ao final do período experimental apontam a
 666 possibilidade de incluir microalga *Arthrospira platensis* tanto em pó quanto viva no sistema
 667 de bioflocos durante o período de berçário de *Litopenaeus vannamei* em densidades super
 668 intensivas.

669 Durante a avaliação dos dados obtidos para a qualidade da água nos diferentes
 670 tratamentos, observou-se que os dados de pH foram menores para os tratamentos de bioflocos
 671 e bioflocos enriquecidos com pó de *A. platensis*. Isto se deve ao fato que um sistema com
 672 mais densidade de camarões aumenta a taxa de respiração, aumentando a concentração de
 673 dióxido de carbono e gerando diminuição de pH (MCINTOSH, 2001).

674 A inclusão de microalga na forma viva não incrementou sua biomassa dentro do
 675 sistema de produção levando ao aumento dos níveis de amônia pela sua própria decomposição
 676 e atingindo valores para o T3 acima dos recomendados (VAN WYK E SCARPA 1999).
 677 MACIAS- SANCHO et al., (2017), encontraram a mesma situação após a suplementação de
 678 *A. platensis* em sistemas superintensivos de produção em água clara. Provavelmente, a adição
 679 de melaço durante o período experimental provocou um escurecimento da água dando mais
 680 chances para o aumento das bactérias heterotróficas, provocando o incremento na taxa de
 681 mortalidade da cianobactéria.

682 Em relação ao resultado de sobrevivência comparando densidades de berçário para
683 camarões em sistema de biofoco, WASIELESKY *et al.* (2013) encontraram relação inversa
684 da sobrevivência com o aumento de densidade sendo afetada apenas na densidade de cultivo
685 maior (6000 cam/m²). A aparição de mortalidade das pós-larvas por efeito de canibalismo
686 também pode ter influenciado nos baixos resultados de sobrevivência obtidos. O uso do
687 sistema de biofocos, além de conseguir manter a qualidade da água com o manejo apropriado
688 (RAY *et al.*, 2011) promove a presença de bactérias capazes de produzir polihydroxibutarato,
689 as quais evitam o crescimento de outras bactérias patogênicas no intestino de camarão
690 (SUPONO *et al.*, 2014) e possibilitam o aumento de densidade de cultivo. Em adição, as pós-
691 larvas de camarão em sistemas de biofocos puramente heterotróficos também melhoram a
692 sobrevivência (WASIELESKY *et al.* (2006). GHAENI e MATINFAR (2013) obtiveram
693 melhores resultados de sobrevivência para o camarão tigre utilizando a microalga *A. platensis*
694 durante a fase larval. Segundo BHOWMIK *et al.* (2009), a *A. platensis* favorece o
695 crescimento de bactérias benéficas no intestino dos camarões. Então por extensão, a
696 comunidade bacteriana estabelecida nos biofocos mixotróficos pode explicar a maior
697 sobrevivência para os tratamentos onde temos *A. platensis* incluída no sistema de biofocos.

698 Pesquisadores anteriores utilizaram macroalgas, *Ulva lactuca* (CRUZ-SUÁREZ *et al.*,
699 2010) e *Gracilaria birdiae* (BRITO *et al.*, 2016) na produção de camarões marinhos obtendo
700 maiores concentrações de proteína no músculo dos que foram alimentados com macroalga.
701 NANDEESHA *et al.* (1998) realizaram com sucesso a substituição total de farinha de peixe
702 por farelo de *A. platensis* na dieta do *Cyprinus carpio* e observaram o aumento na
703 concentração da proteína muscular. Já para camarões marinhos, os resultados amostraram
704 uma maior deposição de proteína muscular para os camarões alimentados com microalga *A.*
705 *platensis* filtrada (MACIAS-SANCHO *et al.*, 2017) e com dietas de 75% de substituição.
706 Esses resultados coincidem com os obtidos ao final deste experimento, sendo possível esta
707 maior deposição de proteína no músculo pela ausência de parede celular da microalga
708 (SASSON, 1997; HENRIKSON, 1989). Em contrapartida, a concentração de lipídios no
709 músculo dos camarões dos tratamentos com inclusão de microalga foi menor. Menores
710 quantidades de lipídios também foram encontradas por MACIAS-SANCHO *et al.* (2017) no
711 músculo de camarões alimentados com *A. platensis*. COLLA *et al.* (2008), atribuíram a
712 diminuição de lipídios no sangue de ratos alimentados com *Spirulina* aos compostos
713 antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados que apresenta a cianobactéria e que tem a
714 capacidade de diminuir os níveis de colesterol no sangue.

715 Foram constatadas diferenças estatísticas significativas na composição proximal dos
716 bioflocos presentes em cada tratamento. O biofoco enriquecido com *A. platensis* viva
717 apresentou valores superiores de proteína quando comparados aos tratamentos do biofoco
718 puro. A microalga é uma fonte rica em proteína (BELAY e KATO, 1996) e a inclusão no
719 meio de produção vai gerar uma maior disponibilidade de nitrogênio na água. A capacidade
720 do material bacteriano de fixar nitrogênio para a formação de proteína é favorecida pela
721 presença de carbono inorgânico decorrente da morte da microalga. Os carboidratos presentes
722 na microalga, até 17% (GERSHWIN e BELAY, 2007) ficaram disponível na coluna de água,
723 facilitando a adição de nitrogênio aos conglomerados. Diferentes pesquisadores indicam que a
724 *A. platensis* está formada por uma grande quantidade de lipopolissacarídeos (STEWART *et*
725 *al.*, 2006) e exopolissacarídeos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013), os quais também podem
726 participar na formação da proteína bacteriana.

727 CONCLUSÃO

728 Com os resultados obtidos nesta pesquisa podemos valorar o efeito positivo da
729 inclusão de microalga *Arthrospira platensis* no sistema de produção superintensivo de pós-
730 larvas de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*, já que melhores resultados na
731 sobrevivência foram obtidos sem produzir efeitos deletérios na qualidade da água do cultivo.
732 A inclusão de microalga tanto em pó quanto viva aumentou o conteúdo protéico dos camarões
733 dos bioflocos inclusos nos tanques de produção. Os efeitos imunoestimulantes dos compostos
734 da cianobactéria possibilitam um aumento na sobrevivência das pós-larvas de *L. vannamei*, já
735 que maiores concentrações de nitrogênio decorrente da inclusão de microalga não afetou a
736 sobrevivência nos tratamentos com microalga em pó e viva. Pelos argumentos acima
737 descritos, pode ser recomendada a inclusão de microalga *A. platensis* em pó no sistema de
738 bioflocos com objetivo de maximizar a sobrevivência do *L. vannamei*.

739 AGRADECIMENTOS

740 Os autores agradecem ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),
741 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de
742 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). M.B. Tesser, L.H. Poersch, L.A.
743 Romano e W. Wasielesky que são os investigadores titulares de bolsa de produtividade.

744 REFERÊNCIAS

- 745 AMBROSI, M.A., REINEHR, C.O., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V., COLLA, L.M.
746 (2009) Propriedades de saúde de Spirulina spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas*
747 *Básica e Aplicada*, **29**, 109-117.
- 748 AMINOT, A., CHAUSSEPIED, M. (1983) *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*.
749 AVNIMELECH, Y. (2009) Biofloc technology. *A practical guide book*. *The World*
750 *Aquaculture Society, Baton Rouge*, 182.
- 751 BELAY, A., KATO, T., OTA, Y. (1996) Spirulina (Arthrospira): potential application as an
752 animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 303-311.
- 753 BENDSCHNEIDER, K., ROBINSON, R.J. (1952) A new spectrophotometric method for the
754 determination of nitrite in sea water.
- 755 BHOWMIK, D., DUBEY, J., MEHRA, S. (2009) Probiotic efficiency of Spirulina platensis-
756 stimulating growth of lactic acid bacteria. *World J. Dairy Food Sci*, **4**, 160-163.
- 757 BRITO, L.O., CHAGAS, A.M., SILVA, E.P., SOARES, R.B., SEVERI, W., GÁLVEZ, A.O.
758 (2016) Water quality, Vibrio density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus*
759 *vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria*
760 *birdiae* (Greville). *Aquaculture research*, **47**, 940-950.
- 761 BURFORD, M.A., THOMPSON, P.J., MCINTOSH, R.P., BAUMAN, R.H., PEARSON,
762 D.C. (2003) Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp
763 ponds in Belize. *Aquaculture*, **219**, 393-411.
- 764 CAI, T., PARK, S.Y., LI, Y. (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by
765 microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **19**,
766 360-369.
- 767 COLLA, L.M., MUCCILLO-BAISCH, A.L., COSTA, J.A.V. (2008) *Spirulina platensis*
768 effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a
769 hypercholesterolemic diet. *brazilian archives of biology and technology*, **51**, 405-411.
- 770 CRUZ-SUÁREZ, L.E., LEÓN, A., PEÑA-RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ-PEÑA, G.,
771 MOLL, B., RICQUE-MARIE, D. (2010) Shrimp/Ulva co-culture: a sustainable
772 alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality.
773 *Aquaculture*, **301**, 64-68.
- 774 DE OLIVEIRA, C.A., DE OLIVEIRA CAMPOS, A.A., RIBEIRO, S.M.R., DE CASTRO
775 OLIVEIRA, W., DO NASCIMENTO, A.G. (2013) Potencial nutricional, funcional e
776 terapêutico da cianobactéria spirulina. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição-*
777 *RASBRAN*, **5**, 52-59.

778 DE SCHRYVER, P., CRAB, R., DEFOIRDT, T., BOON, N., VERSTRAETE, W. (2008) The
779 basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277,
780 125-137.

781 DENG, R., E CHOW, T.J. (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities
782 of microalgae Spirulina. *Cardiovascular therapeutics*, 28.

783 EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J. (2006) Engineering analysis of the
784 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of
785 ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, **257**, 346-358.

786 FURTADO, P.S., POERSCH, L.H., WASIELESKY JR, W. (2011) Effect of calcium
787 hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical
788 performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT)
789 systems. *Aquaculture*, **321**, 130-135.

790 GAD, A.S., KHADRAWY, Y.A., EL-NEKEETY, A.A., MOHAMED, S.R., HASSAN, N.S.,
791 ABDEL-WAHHAB, M.A. (2011) Antioxidant activity and hepatoprotective effects of
792 whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition*, **27**, 582-589.

793 GAONA, C., POERSCH, L., KRUMMENAUER, D., FOES, G., WASIELESKY, W. (2011)
794 The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus*
795 *vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of*
796 *Recirculating Aquaculture*, **12**.

797 GERSHWIN, M.E., E BELAY, A. (2007) *Spirulina in human nutrition and health*, CRC
798 press.

799 GHAENI, M., E MATINFAR, A. (2013) Application of Spirulina for Feeding Larvae of
800 Green Tiger Shrimp, *Peneaus semisulcatus*. *Journal of Marine Science. Research &*
801 *Development*, **3**, 1.

802 GUILLARD, R.R. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In:
803 *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, pp. 29-60.

804 HENRIKSON, R. (1989) Earth food spirulina. *Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc*,
805 187.

806 HORWITZ, W., E LATIMER, G. (2000) Official Methods of Analysis of AOAC
807 International, Gaithersburg MA, USA. *Association of Official Analytical chemist*.

808 KIM, S.K., PANG, Z., SEO, H.C., CHO, Y.R., SAMOCHA, T., JANG, I.K. (2014) Effect of
809 bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus*
810 *vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, **45**, 362-371.

811 KRUMMENAUER, D., LARA, G., FOÉS, G., POERSCH, L., WASIELESKY JR, W. (2013)
812 Sistema de Bioflocos: É possível reutilizar a água por diversos ciclos. *Panorama da*
813 *aquicultura*, **136**, 40-47.

814 LIN, Y.C., TAYAG, C.M., HUANG, C.L., TSUI, W.C., CHEN, J.C. (2010) White shrimp
815 *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis*
816 showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH
817 stress. *Fish & shellfish immunology*, 29, 1092-1098.

818 LIU, Y.J., DU, J.L., CAO, L.P., JIA, R., SHEN, Y.J., ZHAO, C.Y., XU, P., YIN, G.J. (2015)
819 Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum*
820 polysaccharides on carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp
821 (*Cyprinus carpio L.*). *International immunopharmacology*, 25, 112-120.

822 MACIAS-SANCHO, J., HOLANDA, M., ROMANO, L.A., WASIELESKY, W., TESSER,
823 M.B., POERSCH, L.H. (2017) *Arthrospira platensis* filtrada como alimento
824 complementariode juveniles de camarón blanco: efectos sobre el crecimiento y
825 sistema inmune.

826 MACIAS-SANCHO, J., POERSCH, L.H., BAUER, W., ROMANO, L.A., WASIELESKY,
827 W., TESSER, M.B. (2014) Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina*
828 *platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and
829 immunological parameters. *Aquaculture*, 426-427, 120-125.

830 MAHAJAN, G., E KAMAT, M. (1995) γ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*.
831 *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 466-469.

832 MCINTOSH, R. (2001) Changing Paradigms in Sahrmp Farming: Establishment of
833 Heterotrophic Bacterial Communities. *The Advocate*, February.

834 MULLER-FEUGA, A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends.
835 *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534.

836 NANDEESHA, M., GANGADHAR, B., VARGHESE, T., KESHAVANATH, P. (1998)
837 Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and
838 organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio L.* *Aquaculture Research*, **29**,
839 305-312.

840 RAY, A. J., DILLON, K. S., LOTZ, J. M. (2011). Water quality dynamics and shrimp
841 (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two
842 levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 127-136.

843 REVERTER, M., BONTEMPS, N., LECCHINI, D., BANAIGS, B., SASAL, P. (2014) Use
844 of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status
845 and future perspectives. *Aquaculture*, **433**, 50-61.

846 SASSON, A. (1997) Microalgal Biotechnologies: Recent developments and prospects for
847 developing countries. In: *2. Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3.*
848 *Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Phuket (Thailand), 7-10 May 1997.*

849 SHAROUD, M.N. (2015) Protective effect of spirulina against paracetamol-induced hepatic
850 injury in rats. *J. Exp. Biol. Agric. Sci*, **3**, 44-53.

851 STANDARD, A. (2002) Methods for the Examination of Water and Wastewater.

852 STEWART, I., SCHLUTER, P.J., SHAW, G.R. (2006) Cyanobacterial lipopolysaccharides
853 and human health—a review. *Environmental Health*, **5**, 7.

854 SUITA, S.M., BALLESTER, E.L., ABREU, P.C., WASIELESKY JR, W. (2015) Dextrose as
855 carbon source in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero
856 exchange system/Dextrosa como fuente de carbono en el cultivo de *Litopenaeus*
857 *vannamei* (Boone, 1931) en un sistema sin recambio de agua. *Latin American Journal*
858 *of Aquatic Research*, **43**, 526.

859 SUPONO, H.J., PRAYITNO, S.B., DARMANTO, Y. (2014) White shrimp (*Litopenaeus*
860 *vannamei*) culture using Heterotrophic Aquaculture System on nursery Phase.
861 *International Journal of Waste Resources*, **4**, 142.

862 UNESCO (1983) Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
863 Intergovernmental Oceanographic Commission Paris.

864 VAN WYK, P., E SCARPA, J. (1999) Water quality requirements and management. *Farming*
865 *marine shrimp in recirculating freshwater systems*, 128-138.

866 VONSHAK, A. (1997) *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and*
867 *biotechnology*, CRC Press.

868 WANG, F., MIAO, M., CHEN, B., WANG, R., SUN, B., REN, D., LU, J. (2015)
869 Antineoplastic activity of γ -linolenic acid extract from *Spirulina platensis* on HepG2
870 cells and its inhibition effect on platelet aggregation. *Food and agricultural*
871 *immunology*, **26**, 97-108.

872 WASIELESKY, W., ATWOOD, H., STOKES, A., BROWDY, C.L. (2006) Effect of natural
873 production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture
874 system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **258**, 396-403

875 WASIELESKY JR, W., FROES, C., FÓES, G., KRUMMENAUER, D., LARA, G.,
876 POERSCH, L. (2013) Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system:
877 the effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish*
878 *Research*, **32**, 799-806.

879

CAPÍTULO 2

880 Uso de *Arthrospira platensis* como complemento alimentar para juvenis do camarão

881 *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931): efeitos sobre o crescimento e sistema imune.

882 Artigo publicado: *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 43(4): 592 - 603, 2017

883 Doi: 10.20950/1678-2305.2017v43n4p592

884 **Observação:** foi incluído um resumo em português.

885 RESUMO EXPANDIDO

886 As microalgas são a base da alimentação de camarões marinhos nas primeiras fases de
887 desenvolvimento. Diferentes espécies, como a *Arthrospira platensis* contém altas
888 concentrações de substâncias antioxidantes além de capacidade de remover os compostos
889 tóxicos acumulados na água produzidos durante os processos de produção aquícola. O
890 experimento era constituído por dois tratamentos em triplicata, onde foi avaliada a aplicação
891 de biomassa filtrada da microalga *A. platensis* como suplemento alimentar para camarões
892 brancos do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. A biomassa de microalga filtrada adicionada no
893 tratamento foi de $2,5 \times 10^6$ células de microalga por litro com a intenção de coproduzir
894 microalga no sistema de criação de camarões e que a mesma sirva de como controladora de
895 nitrogenados e como fonte alimentar para o camarão branco. O experimento estava composto
896 por um sistema de produção estático de seis unidades experimentais, com volume útil de 250
897 litros de água marinha (30ppt), onde se estocaram 300 camarões m^{-2} com peso inicial de
898 $0,7 \pm 0,2$ g. No final do experimento (42 dias) foram avaliados o desempenho zootécnico e
899 parâmetros imunológicos. A qualidade da água dos tanques foi avaliada ao longo do
900 experimento e os dados registrados para a concentração de amônia foram maiores que os
901 indicados para o desenvolvimento normal da espécie. Os camarões alimentados com a *A.*
902 *platensis* como suplemento alimentar atingiram tamanhos significativamente maiores ($6,75$ g
903 $\pm 0,42$) que os camarões do tratamento controle ($6,01$ g $\pm 0,11$) e estão apresentados na Tabela
904 5. Não tendo sido observadas diferenças estatísticas na sobrevivência, com valores maiores de
905 98% para os dois tratamentos. As composições proximais do músculo dos camarões obtidas
906 ao final do experimento mostraram diferenças estatísticas na quantidade de proteína e de
907 lipídios acumulados, sendo valores maiores de proteína acumulada e menores de lipídios para
908 os camarões que receberam a microalga como suplemento alimentar ($19,71 \pm 0,21$ e $3,22 \pm$
909 $0,27$) que para os camarões do tratamento controle ($18,98 \pm 0,40$ e $3,96 \pm 0,79$) e estão
910 apresentados na Tabela 6. Cabe destacar que o uso de microalga filtrada no meio da produção
911 de camarões beneficia o sistema imunológico dos crustáceos porque os valores dos
912 parâmetros imunológicos, proteína na hemolinfa, percentual de hemócitos granulados e
913 hialinos e índice de apoptoses, também foram diferentes estatisticamente, obtendo maiores
914 concentrações de proteína na hemolinfa para o tratamento com suplementação de *A. platensis*
915 ($129,53 \pm 3,27$) do que para o tratamento sem suplementação ($120,13 \pm 2,47$), dados
916 apresentados na Tabela 7. O percentual de hemócitos tanto granulados como hialinos também
917 foram diferentes para os dois tratamentos, sendo maiores os valores de hemócitos granulados e

918 menores de hemócitos de hialinos do tratamento com aporte de microalga e vice-versa para o
 919 tratamento controle. Da mesma maneira, os índices de apoptoses também foram diferentes
 920 estatisticamente para os tratamentos, sendo maiores para o tratamento que recebeu a
 921 microalga que no tratamento controle. Contrariamente ao esperado, já que a microalga gera
 922 diminuição na atividade apoptótica dos hemócitos para evitar a propagação de viroses. Esses
 923 dados elevados de apoptoses, conjuntamente com o elevado percentual de hemócitos
 924 granulados explicam a melhoria do sistema imunológico dos camarões que são alimentados
 925 com microalga e o maior crescimento dos mesmos mesmo em condições estressantes com
 926 altos níveis de amônia nos tanques como o acontecido durante o experimento. Assim,
 927 subministrar a microalga como alimento suplementar no sistema de produção de camarões
 928 favorece o desempenho e sistema imunológico do *L. vannamei*.

929 Palavras chave: desenvolvimento; imune estimulante; nutrição; suplemento; Spirulina.

930 Tabela 5. Desempenho zootécnico de camarões alimentados com ração comercial (Comercial)
 931 e com ração comercial + *A. platensis* viva (Apsup)

TRAT	Comercial	Apsup
PF(g)	6,01±0,11 b	6,75±0,42 a
GPS	1,20±0,21 b	1,35±0,21 a
TCA	1,12±0,07	1,06±0,01
TCE	4,82±0,03 b	5,00±0,11 a
SB (%)	98,09±0,95	99,05±0,95

932 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p< 0,05)

933 Peso final (PF), ganho peso semanal (GPS), taxa de conversão alimentar (TCA), taxa de
 934 crescimento específico (TCE), sobrevivência (SB).

935 Tabela 6. Composição proximal dos camarões ao final do experimento alimentados com ração
 936 comercial (Comercial) e com ração comercial + *A. platensis* viva (Apsup). Os dados estão
 937 expressos como média ± desvio padrão (n= 5).

TRAT	Comercial	ApSup
Proteína (%)	18,98±0,40 b	19,71±0,21 a
Cenizas (%)	1,76±0,04	1,83±0,11
Lípidos (%)	3,96±0,79 a	3,22±0,27 b
Humidade (%)	76,61±0,25	76,16±0,11

938 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p< 0,05)

939 Tabela 7. Parâmetros imunológicos ao final do experimento para camarões alimentados com
 940 ração comercial (Comercial) e com ração comercial + *A. platensis* viva (Apsup). Os dados
 941 estão expressos como média ± desvio padrão (n= 5).

TRAT	Comercial	Apsup
TPC (mg ml ⁻¹)	120,13±2,47 b	129,53±3,27a
Hg (%)	65,40±2,92 b	76,00±2,97 a
Hh (%)	34,60±2,92 a	24,60±2,97 b
Apoptosis	0,95±0,82 b	3,35±1,35 a

942

Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p< 0,05)

943

Conteúdo de proteína na hemolinfa (TPC); Percentual de hemocitos granulares (Hg%);

944

Percentual de hemocitos hialinos (Hh%); Apoptose.

945

ANEXO 1

946 *Arthrospira platensis* FILTRADA COMO ALIMENTO COMPLEMENTARIO DE JUVENILES DEL
947 CAMARÓN BLANCO: EFECTOS SOBRE CRECIMIENTO Y SISTEMA INMUNE

948 Joaquin MACIAS-SANCHO¹, Mariana HOLANDA¹, Luis Alberto ROMANO², Wilson
949 WASIELESKY³, Marcelo Borges TESSER⁴, Luís Henrique POERSCH⁴

950 1 Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal de Rio Grande, Instituto de Oceanografia,
951 FURG-IO, Rio Grande- RS - Brasil

952 2 Docente Departamento de Patologia de Organismos Aquaticos/LIPOA, Instiuto
953 Oceanografico Universidade Federal de Rio Grande- FURG-IO, Grande-Rio - RS-Brasil

954 3 Docente titular Departamento de Aquicultura, Instiuto Oceanografico Universidade Federal
955 de Rio Grande- FURG-IO, Grande-Rio - RS-Brasil

956 4 Docente adjunto Departamento de Aquicultura, Instiuto Oceanografico Universidade Federal
957 de Rio Grande- FURG-IO, Grande-Rio - RS-Brasil

958 e-mail: joaquinmaciassancho@gmail.com (autor correspondente)

959 Endereço autor: Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade

960 Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália km 8, Rio Grande, RS, Cx.P. 474, CEP
961 96.200-970,Brasil. Tel./fax: +55 5332368042.

962 *Apoio financeiro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Conselho
963 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de
964 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

965 RESUMEN

966 De forma general, las microalgas son fuente de alimento indispensable durante las primeras
967 fases de desarrollo de los camarones marinos. Algunas microalgas, como la *Arthrospira platensis*,
968 son ricas en sustancias antioxidantes, y tienen la capacidad de retirar compuestos tóxicos del
969 agua en los sistemas de producción acuícola. De este modo, constituimos un experimento con
970 dos tratamientos triplicados, donde se evaluó la aplicación de biomasa filtrada de microalga *A.*
971 *platensis* como suplemento alimenticio para camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.
972 Se utilizó un sistema de cultivo estático de seis unidades, con volumen útil de 250 litros de agua
973 marina (30), donde se sembraron 105 camarones (300 camarones m⁻²) con peso medio inicial de
974 0,7±0,2 g. Los parámetros de calidad del agua fueron controlados diariamente, al final del
975 experimento (42 días) se evaluaron parámetros inmunológicos y de desempeño zootécnico. El
976 resultado de crecimiento fue significativamente mayor para el tratamiento donde se incluyó
977 *A.platensis* como suplemento alimenticio. Se observaron también mejores resultados en los
978 parámetros inmunológicos en el mismo tratamiento. Desta forma, el crecimiento y el sistema
979 inmunológico *L. vannamei* en el tratamiento con microalga como alimento suplementario se
980 vieron favorecidos debido a las características nutricionales y efectos inmunoestimulantes de la
981 microalga *A. platensis*.

982 *Palabras clave: desarrollo, inmunoestimulante, nutrición, suplemento.*

983 FILTERED *Arthrospira (Spirulina platensis)* AS A FOOD SUPPLEMENT FOR JUVENILE
984 SHRIMP *Litopenaeus vannamei*: EFFECTS ON GROWTH AND IMMUNE SYSTEM

985 ABSTRACT

986 Microalgae are an important food source during the primary stages of marine shrimps. Some
987 microalgae like *Arthrospira platensis*, are rich in antioxidant substances and also have the
988 capacity to remove toxic compounds from the water in aquaculture systems. The trial
989 consisted in two treatments in triplicate where was assessed the inclusion of filtered

990 microalgae *A. platensis* as feed supplementation during production of juvenils *Litopenaeus*
991 *vannamei*. Experimental desing based on a static system with six 250 litres tanks with marine
992 water (30), where were stocked 105 shirmps (300 shrimp m⁻²) with average wheight of 0,7 ±0,2
993 g. The water quality parameters were controlled daily, at the end of the trial (42 days) have been
994 evaluated the growth and immunological parameters of shrimps. Results at the end showed
995 significatives differences among the treatments. Shrimps that received supplementation of
996 microalgae *A. platensis* showed higher growth and also better values of shirmps immunological
997 parameters. Thus, these results allow concluded that the supplementation of flitered microalgae.
998 *A. platensis* improved growth and immunological parameters of white shrimp *L. vannamei* by
999 the nutritional and immunological powder of *A. platensis*.

1000 *Key words: antioxidant, imunology, microalgae, nutrition, shrimp, supply.*

1001 INTRODUCCIÓN

1002 Los juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) tienen la
1003 capacidad de filtrar, ingerir y digerir microalgas suspendidas en la columna de agua
1004 (GAMBOA-DELGADO *et al.*, 2014). Esta característica de utilización de microalgas por parte del
1005 *L. vannamei* permite el uso de microalga en el seno de producción de estos crustáceos. GE *et al.*
1006 (2015) realizaron un co-cultivo de tres tipos de microalgas (*Platymonas helgolandica*, *Chlorella*
1007 *vulgaris* y *Chaetoceros mulleri*) con crustáceos de la especie *L. vannamei* consiguiendo mantener la
1008 calidad del agua y mejorar el desempeño de los camarones. Siendo estas tres microalgas
1009 mencionadas menores y con morfología celular diferente que la *Arthrospira platensis* (*A.*
1010 *platensis*), la cual es filamentosa y de mayor tamaño, lo que según UTHAYAKUMAR *et al.* (2015)
1011 la permite mantenerse por más tiempo flotando y disponible en la columna de agua.

1012 Debido al elevado índice protéico, el poder antioxidante y el conocimiento sobre la técnica de
1013 producción de la microalga *A. platensis* permite que la misma sea considerada como alimento
1014 alternativo de alto potencial para la acuicultura (BELAY *et al.*, 1996) y humanos (DALLE ZOTE
1015 *et al.*, 2014). CHUNTAPA *et al.* (2003) observaron que utilizar la microalga *A. platensis* en el
1016 mismo tanque de producción de camarón blanco ofrece ventajas en el mantenimiento de los
1017 parámetros de calidad de agua. Esta especie de microalga se puede beneficiar de los
1018 compuestos nitrogenados acumulados en los efluentes del sistema de producción de

1019 organismos acuáticos, pudiendo ser alternativa para la retirada de productos nitrogenados en
1020 sistemas de co-producción de camarones marinos (SOMBATJINDA *et al.*, 2014). Conociendo la
1021 habilidad sobre el mantenimiento de la calidad de agua de la *A. platensis* (CHUNTAPA *et al.*,
1022 2003; SOMBATJINDA *et al.*, 2014), la capacidad del camarón blanco de alimentarse de
1023 microalgas en la columna de agua (GAMBOA-DELGADO *et al.*, 2014) y el efecto positivo sobre
1024 la retirada de nitrogenados por parte de las algas en co-cultivo, como ejemplo la *Ulva sp.*
1025 (CRUZ-SUAREZ *et al.*, 2010; PEÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; GE *et al.*, 2015 y PALLAORO *et al.*,
1026 2016), permite pensar que la co-producción de microalgas y camarones en el mismo sistema de
1027 producción se comporte analógicamente. Además de los beneficios del sistema de producción
1028 también se destaca la mejora del sistema inmunológico del camarón blanco cuando se alimenta
1029 con *A. platensis* seca (MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014).

1030 Desde otro punto de vista, se conoce que el sistema inmunológico de los camarones se rige, en
1031 gran parte, por la acción de los hemocitos en combate contra los organismos patógenos. Así la
1032 disminución del número de hemocitos en el sistema circulatorio puede afectar a las tasas de
1033 sobrevivencia, la capacidad inmune y, consecuentemente, aumentar la susceptibilidad a
1034 patógenos (LORENZON *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-RAMOS *et al.*, 2008;
1035 WANG *et al.*, 2013). Experimentos realizados durante los últimos años confirman que incluir
1036 fuentes naturales en las dietas mejoran la respuesta inmunológica de *L. vannamei* (ZHANG *et al.*,
1037 2010; MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014; ANAND *et al.*, 2015). De esta forma, se cree que ofertar *A.*
1038 *platensis* filtrada como alimento alternativo en los estanques puede generar beneficios en el
1039 crecimiento y en el sistema inmunológico de los organismos producidos.

1040 Considerando los resultados positivos observados por otros investigadores, en términos de
1041 calidad de agua, crecimiento y mejoría del sistema inmunológico de *L. vannamei*, el objetivo de
1042 este experimento fue evaluar el efecto de la inclusión de la microalga *A. platensis* filtrada sobre
1043 el desarrollo y en los parámetros inmunológicos del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en
1044 sistemas superintensivos de producción.

1045 MATERIAL Y MÉTODOS

1046 *Producción de camarones*

1047 El presente estudio transcurrió se llevo a cabo en la estación marina de acuicultura de la
1048 Universidad Federal de Rio Grande, RS-Brasil, durante de 42 días y fueron utilizados juveniles

1049 de camarón blanco *L. vannamei* con peso inicial medio de $0,7 \pm 0,2g$. Se utilizaron seis tanques
1050 plásticos, con volumen útil de 250 litros y área de $0,35m^2$ independientes entre si formando un
1051 sistema estático de agua clara con renovaciones diarias, donde se distribuyeron aleatoriamente
1052 105 camarones por cada tanque, resultando de esta forma, una densidad de 300 camarones m^{-2} .
1053 Los dos tratamientos comparados durante el ensayo tuvieron como única diferencia la
1054 suplementación o no de la microalga *A. platensis* como alimento.

1055 Se utilizó agua marina con salinidad 30 previamente filtrada en filtros de 25, 5 e $1 \mu m$, clorada
1056 con hipoclorito de sodio a 15 ppm y tratada con ácido ascórbico (1 ppm), posteriormente se
1057 trató con EDTA (20 ppm). Durante el experimento se almacenó agua tratada en tanques de
1058 10.000 L, de la misma manera descrita anteriormente, y mantenida a $27^\circ C$ para su posterior uso
1059 en las renovaciones diarias de agua del sistema experimental.

1060 *Parametros físico químicos del agua*

1061 Salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto se midieron dos veces al día con la sonda
1062 multiparámetros YSI® modelo 556. Amonio, nitrito, nitrato y fosfato se determinaron por las
1063 metodologías descritas por la UNESCO (1983), BENDSCHNEIDER y ROBINSON (1952) y
1064 AMINOT y CHAUSSEPIED (1983), respectivamente. El amonio era medido diariamente,
1065 mientras que nitrito, nitrato y fosfato fueron controlados dos veces por semana a lo largo de los
1066 42 días, los resultados obtenidos se mantuvieron dentro de los padrones considerados como
1067 no perjudiciales para el crecimiento de *L. vannamei*. La alcalinidad era medida también dos
1068 veces por semana según la metodología de APHA (1998) y su valor se mantuvo encima de 100
1069 $mg L^{-1}$ de $CaCO_3$, el cual es necesario para un buen desarrollo de camarón (FURTADO *et al.*,
1070 2011). Se trabajó bajo fotoperíodo de 12 horas claro-12 horas oscuro. Diariamente, se sifonaba el
1071 35% del volumen de agua de cada tanque para evitar la acumulación de heces, mudas y materia
1072 orgánica. A continuación, se realizaba la renovación de agua de cada tanque con el agua de
1073 reserva.

1074 *Fuentes de alimentación*

1075 En el transcurso del experimento todos los tratamientos fueron alimentados con ración
1076 comercial J40 Guabi® (Brasil) y un único tratamiento además recibía filtrado de microalga *A.*
1077 *platensis* como suplemento alimentario. La cepa de *A. platensis* se obtuvo del Laboratorio de

1078 Ingeniería Bioquímica de la Universidad Federal de Rio Grande (LEB-FURG). La microalga
1079 utilizada durante este ensayo se cultivó en tanques cilíndricos de 250 L de volumen útil, en
1080 medio f/2 modificado de Guillard (1975) en la Estación Marina de Acuicultura de de la
1081 Universidad Federal de Rio Grande (EMA/FURG). El medio de cultivo utilizado para la
1082 producción de microalga se componía de agua de mar, filtrada por filtro CUNO® (1 mm de
1083 poro), tratada con 0,15 mL L⁻¹ de hipoclorito de sodio al 5% y neutralizada con 0,04 g L⁻¹ de
1084 ácido ascórbico. La solución padrón para el cultivo estaba formada por una mezcla de 150 g L⁻¹
1085 de NaNO₃, 8 g L⁻¹ de FeCl₃, 9 g L⁻¹ de Na₂EDTA y 1 mL L⁻¹ de solución metálica (5 mg L⁻¹ de
1086 CoCl₂; 9 mg L⁻¹ de ZnCl₂; 100 mg L⁻¹ de MnCl₂; 6 mg L⁻¹ de CuSO₄ y 3 mg L⁻¹ de (NH₄)₆Mo₇O₂₄)
1087 más otra solución de fosfato (9 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ y 1g L⁻¹ de vitamina B₁₂). La solución padrón
1088 se obtuvo de mezclar 1 mL L⁻¹ de cada una de las soluciones descritas e incluidas *a posteriori*
1089 para preparar el medio de cultivo. Las producciones de microalgas se realizaron con salinidad
1090 25, pH 8,0, 30°C, intensidad luminica de 1500 lux, fotoperíodo de 24h luz, aireación constante
1091 hasta la densidad de cultivo de 2,5 x 10⁶mg L⁻¹.

1092 Los análisis de composición centesimal del balanceado y de la microalga *A. platensis* fueron
1093 realizado de acuerdo con la metodología propuesta por AOAC (2000) en el laboratorio de
1094 nutrición de organismos acuáticos (LANOA) de la FURG.

1095 *Alimentación*

1096 La alimentación de los camarones de todos los tanques con balanceado comercial fue realizada
1097 dos veces al día (8:00 y 18:00). Durante el transcurso del experimento se realizaron biometrias
1098 semanales para determinar la biomasa de cada tanque y así ajustar la cantidad de alimento
1099 balanceado que debía ser suministrado de acuerdo JORY *et al.* (2001). La única diferencia entre
1100 los diferentes tratamientos fue la suplementación de microalga filtrada o no. La cantidad de
1101 microalga utilizada estaba de acuerdo con CHUNTAPA *et al.* (2003), 4x10⁶ de cel L⁻¹, y de
1102 GHARIBI *et al.* (2015), 9x10⁷cel L⁻¹, al principio y final del experimento respectivamente. La
1103 cantidad de microalga suministrada en un tratamiento era compensada en el tratamiento sin
1104 suplementación de microalga adicionando el 1% a lo establecido por JORY *et al.* (2001). A partir
1105 del decimoquinto día se llevo a cabo este aumento de densidad de microalga para poder ajustar
1106 la oferta de microalga con el tamaño de los camarones y el uso del exceso de nitrogenados por
1107 parte de las microalgas presentes en los sistemas de producción. Cada vez que se realizaban
1108 renovaciones parciales de agua era estimada la densidad de microalga residual por medio de

1109 conteos, de esta forma se conocía la concentración de microalga necesaria para conseguir las
1110 densidades de la misma indicada anteriormente. La concentración de microalga necesaria era
1111 obtenida tras el filtrado de un volumen conocido de medio de cultivo de microalga en malla de
1112 20µm para a continuación ser adicionado en los tanques correspondientes.

1113 *Indicadores de Crecimiento de los Camarones*

1114 Para evaluar el crecimiento de los animales al final del período experimental se analizaron los
1115 siguientes parámetros: Peso ganado por semana= (peso final/ tiempo de experimento
1116 [semanas]); Tasa de conversión de alimento= alimento seco total suministrado (g) / peso
1117 humedo ganado (g); Tasa de crecimiento específico= $(100 \times [\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}] /$
1118 $\text{tiempo de experimento [días]})$; Sobrevivencia %= $(100 \times [\text{número final de camarones} / \text{número}$
1119 $\text{inicial de camarones}])$.

1120 Un total de 60 organismos (10 por unidad experimental) se colectaron al final del experimento
1121 para la realización de análisis de composición proximal del músculo realizado en el LANOA de
1122 la FURG. Concentración de proteínas, extracto etéreo, cenizas y humedad muscular del
1123 músculo fue calculada según el protocolo de la AOAC (2000).

1124 *Estudio del sistema inmunológico de L. vannamei*

1125 Al final del experimento, 5 camarones por unidad experimental fueron colectados para la
1126 extracción de hemolinfa y realización de los diferentes análisis para determinar el estado del
1127 sistema inmune de los camarones cultivados en los dos tratamientos. La hemolinfa
1128 (aproximadamente 45 µL totales por cada camarón) fue retirada por inyección seno ventral,
1129 15µL de hemolinfa por tratamiento se utilizaron para la cuantificación de hemócitos según la
1130 técnica de May-Grunwald-Giemsa. Este análisis se llevo a cabo con ocular de integración de 5
1131 líneas y 25 puntos (Carl Zeiss) según WEIBEL (1980). Otros 15 µL de hemolinfa se utilizaron
1132 para determinar la concentración de proteínas totales de la hemolinfa por el método descrito
1133 por BRADFORD (1976).

1134 Otra alícuota de 0,5 µL por camarón fue empleada para la preparación de 5 esfregazos en
1135 lámina positivada por cada tratamiento. En estas láminas se aplicó el kit ApopTag®Peroxidase

1136 In situ (Millipore) "TUNEL REACTION", como descrito por CHARRIAUT-MARLANGUE y
1137 BEN-ARI (1995) y WANG y ZHANG (2008).

1138 *Análisis estadísticas*

1139 Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar el efecto de la
1140 suplementación del filtrado de microalga *Arthrospira platensis* en el crecimiento e inmunología
1141 de *Litopenaeus vannamei*, todos los datos cumplieron las premisas de normalidad del test de
1142 Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad del test de Levene. Posteriormente se aplicó el test de
1143 Newman-Keuls para confirmar la existencia de diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los
1144 tratamientos.

1145 RESULTADOS

1146 *Parámetros fisicoquímicos del agua*

1147 Durante el desarrollo del experimento los dos tratamientos matuvieron registros de salinidad
1148 de 30, temperatura media de 27°C, concentración de oxígeno disuelto de 4,8 mg L⁻¹ y pH medio
1149 de 7,85. Los valores de temperatura, oxígeno disuelto, pH amonio, nitrito, nitrato y fosfato no
1150 presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, estos valores están expresados en la
1151 Tabla 1.

1152 Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua obtenidos a lo largo del experimento,
1153 representados como valores medios \pm desvío padrón (n=3). Comercial: balanceado comercial;
1154 Apsup: balanceado comercial más suplementación de *A. platensis* filtrada; T°: temperatura; D.O:
1155 Oxígeno disuelto; [NH₄⁺]: amonio; [NO₂⁻]: nitrito; [NO₃⁻]: nitrato; [PO₄]: fosfato.

	Comercial	Apsup
T(°C)	29,75 \pm 1,88	29,50 \pm 1,98
pH	7,82 \pm 0,18	7,92 \pm 0,14
D.O(mg L ⁻¹)	4,80 \pm 0,56	4,75 \pm 0,67
[NH ₄ ⁺] (mg L ⁻¹)	3,91 \pm 2,21	5,10 \pm 2,86

[NO ₂](mg L ⁻¹)	0,08±0,11	0,08±0,15
[NO ₃](mg L ⁻¹)	0,02± 0,01	0,03±0,01
[PO ₄](mg L ⁻¹)	0,84±0,29	1,09±0,45

1156 *Fuentes de alimentación*

1157 A lo largo del experimento se utilizaron dos fuentes de alimentos con composición proximal
1158 descrita en el Tabla 2.

1159 Tabla 2. Composición proximal de alimentos (g 100g⁻¹ en la materia seca) ofertados (n=6) en la
1160 materia seca.

Alimentos	Proteínas (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Humedad (%)
Comercial	39,8±0,35	12,11±0,59	9,13±0,04	6,28±0,02
<i>A. platensis</i>	65,3±0,24	4,97±0,21	2,92±0,95	88,48±0,05

1164 *Datos zootécnicos*

1165 Los resultados de los parámetros zootécnicos obtenidos al final del experimento están indicados
1166 en la Tabla 3. Se obtuvieron diferencias significativas (p<0,05) entre los tratamientos,
1167 obteniéndose mayor peso final en el tratamiento donde se suplementó microalga. También
1168 fueron observadas diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en el crecimiento
1169 semanal y la tasa de crecimiento específico, resultando valores mayores en el tratamiento que
1170 recibía suplementación de *A. platensis*. La sobrevivencia fue superior al 98% en todos los
1171 tratamientos.

1172 Tabla 3. Valores medios ± desvío padrón (n=3) del peso final e indicadores de crecimiento para
1173 *L. vannamei* al final de 42 días de experimento. TRAT: tratamiento; Comercial: balanceado
1174 comercial; Apsup: balanceado comercial más suplementación de *A. platensis* filtrada; PF: peso
1175 final (gramos); GPS: ganancia de peso semanal; TCA: tasa de conversión de alimento; TCE: Tasa
1176 de crecimiento específico; SB: sobrevivencia. Letras diferentes en la vertical indican diferencias
1177 significativas.

TRAT	Comercial	Apsup
PF(g)	6,01±0,11 ^b	6,75±0,42 ^a
GPS	1,20±0,21 ^b	1,35±0,21 ^a
TCA	1,12±0,07	1,06±0,01
TCE	4,82±0,03 ^b	5,00±0,11 ^a
SB (%)	98,09±0,95	99,05±0,95

1178 Los resultados de composición proximal del músculo de los camarones estan representados en
1179 la Tabla 4. El tratamiento donde se suplementó *A. platensis* presentó mayores concentraciones
1180 de proteína muscular observandose diferencias estadísticas significativas respecto a los
1181 camarones que no recibieron microalga como suplemento alimenticio. Además, entre las
1182 concentraciones de extracto etéreo musculares de los diferentes tratamientos también se
1183 obtuvieron diferencias significativas, siendo esta vez mayor la concentración para los animales
1184 que no comieron microalga.

1185 Tabla 4. Composición proximal del músculo de *Litopenaeus vannamei*, Comercial: alimentado con
1186 dieta comercial, Apsup: alimento comercial más *A. platensis* (n=6, materia húmeda- peso ±
1187 desvío padrón). Letras diferentes en la vertical indican diferencias significativas.

TRAT	Comercial	ApSup
Proteína (%)	18,98±0,40 ^b	19,71±0,21 ^a
Cenizas (%)	1,76±0,04	1,83±0,11
Lípidos (%)	3,96±0,79 ^a	3,22±0,27 ^b
Humedad (%)	76,61±0,25	76,16±0,11

1188 *Resultados de parámetros inmunológicos*

1189 Los resultados de los parámetros inmunológicos obtenidos al final del experimento estan
 1190 expresados en la Tabla 5. La concentración de proteínas de la hemolinfa fue estadísticamente
 1191 diferente y superior para los camarones alimentados con *A. platensis*. Para los datos de
 1192 hemócitos granulados e hialinos se observaron diferencias estadísticas significativas, siendo
 1193 encontrados valores de porcentajes mayores en los hemocitos granulados de la hemolifa para los
 1194 grupos que recibieron suplementación de *A. platensis*, mientras que los porcentajes de hemócitos
 1195 hialinos fueron menores para este mismo tratamiento. El índice de apoptosis también presentó
 1196 diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, obteniendo mayores valores en
 1197 tratamiento que tuvo *A. platensis* como suplemento alimenticio.

1198 Tabla 5. TPC: Concentración de proteínas totales; Hg: porcentajes de hemócitos granulados; Hh:
 1199 porcentajes de hemócitos hialinos; Apoptosis: apoptosis celular en la hemolinfa de camarones.
 1200 Letras diferentes en la vertical indican diferencias significativas.

TRAT	Comercial	Apsup
TPC (mg ml ⁻¹)	120,13±2,47 ^b	129,53±3,27 ^a
Hg (%)	65,40±2,92 ^b	76,00±2,97 ^a
Hh (%)	34,60±2,92 ^a	24,60±2,97 ^b
Apoptosis	0,95±0,82 ^b	3,35±1,35 ^a

1201 DISCUSIÓN

1202 Los análisis de calidad del agua mostraron que hubo un aumento de los nitrogenados disueltos
 1203 durante el experimento, probablemente debido a la alta densidad de camarones por unidad
 1204 experimental (300 cam m⁻²), la degradación del alimento balanceado, la excrección de los
 1205 camarones y la muerte de la microalga en los tanques donde fue suministrada como
 1206 suplemento alimeticio. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos en los
 1207 valores de nitrogenados. Durante el desarrollo del experimento fueron alcanzados valores de
 1208 concentración de amonio de 11mg NH₄ L⁻¹ para el tratamiento suplementación de microalga
 1209 filtrada, y valores de 8,8 mg NH₄⁺ L⁻¹ en el tratamiento sin inclusión de la microalga. Estes
 1210 valores de la concentración de amonio no difieren estadísticamente entre los tratamientos y son

1211 mas altos que los obtenidos por GE *et al.* (2015), donde diferentes microalgas crecieron
1212 utilizando amonio y nitrito acumulado en el sistema compartido con camarón blanco. Cabe
1213 destacar que los valores de la concentración de amonio en el agua de los tanques de producción
1214 fueron mayores que los valores recomendados por VAN WYK y SCARPA (1999),
1215 probablemente porque la microalga que no se desarrollaba acababa muriendo y, en
1216 consecuencia, producía un aumento en la concentración de nitrógeno total en el agua de los
1217 estanques. Aún encontrándose altos valores en la concentración de amonio en ambos
1218 tratamientos, no se registraron altas tasas de mortalidad por toxicidad de amonio ya que se
1219 evitó la exposición a estas altas concentraciones de amonio durante períodos prolongados por
1220 medio de las renovaciones diarias.

1221 Los resultados de crecimiento obtenidos en los diferentes tratamientos al final del experimento
1222 pueden ser efecto directo de la suplementación de *A. platensis* filtrada como suplemento
1223 alimenticio. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por CHUNTAPA *et al.*
1224 (2003) y SOMBATJINDA *et al.* (2014) en sistemas de co- producción de camarón blanco y
1225 microalga, también conocidos como sistemas de producción en agua verde. Utilizar micro y
1226 macro algas dentro de sistemas de criación de especies acuáticas puede favorecer el desempeño
1227 de las mismas, ya que diferentes especies acuáticas tienen la capacidad de aprovechar los
1228 organismos vegetales marinos como fuente de alimento y así disminuir los costos de producción
1229 (SÁNCHEZ *et al.*, 2012). Anteriormente ya se obtuvieron resultados positivos en el crecimiento
1230 de crustáceos utilizando diferentes especies de algas y microalgas en el medio de producción
1231 acuícola (PEÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; CRUZ-SUAREZ *et al.*, 2010; GHARIBI *et al.*, 2015). Al
1232 igual que ocurrió durante el presente ejercicio, donde también se observaron mejores tasas de
1233 crecimiento de los camarones en sistemas mixtos con microalgas que en sistemas de producción
1234 de camarón tradicional.

1235 El nivel de proteína acumulada en el músculo de los camarones alimentados con
1236 suplementación de microalga filtrada *A. platensis* es superior al acumulado en camarones
1237 alimentados únicamente con balanceado comercial. La mayor cantidad de proteína encontrada
1238 en el músculo probablemente sea por causa de que en el tratamiento donde se suplementó la *A.*
1239 *platensis*, se ofertó mayor cantidad de proteína. De acuerdo con HENRIKSON (2009) esta
1240 microalga no posee pared celular, lo que facilita la digestión de la misma y atribuyendo de esta
1241 manera mayor cantidad de proteína en el músculo del camarón blanco. Estos resultados
1242 coinciden con los datos presentados por ABDEL-TAWWAB y AHMAD (2009), que también
1243 obtuvieron mayor contenido proteico en el músculo de *Tilapia* del Nilo alimentada con *A.*

1244 *platensis*. Esta acumulación de proteína en el músculo de los animales alimentados con
1245 microalga fresca confirma que ofertando mayor cantidad de proteína digestible, esta se
1246 acumulará más fácilmente y permitirá un mejor desempeño zootécnico de los organismos.

1247 Por otra parte, al tener valores más altos de proteína siendo ofrecida como alimento afectará al
1248 nivel de lípidos acumulados en el músculo de camarón, ya que ingerir más proteína provoca
1249 que la acumulación de lípidos en el músculo sea menor haciendo que la proteína provoque la
1250 utilización de lípidos como fuente de energía (PASCUAL *et al.*, 2006). Así pues durante este
1251 experimento, la deposición de lípidos en el músculo de camarón fue menor en los animales
1252 alimentados con balanceado y microalga filtrada.

1253 Debido a que la microalga *A. platensis* tiene alto poder nutricional y antioxidante contribuye
1254 mejorando la salud de peces y camarones (WATANUKI *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2010; TAYAG *et*
1255 *al.*, 2010; MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014). La actividad inmunoestimulante de la *A. platensis*
1256 probablemente también influyó en el registro de diferencias significativas en los parámetros
1257 inmunológicos de *L. vannamei* al final del experimento.

1258 De acuerdo con PÉREZ-JAR (2006) el nivel de proteína en la hemolinfa es un buen indicador de
1259 la calidad de la dieta (CEDENÑO *et al.*, 2000; PASCUAL *et al.*, 2003), como condición nutricional
1260 (LORENZON *et al.*, 2011) y en general del estado de salud (PERAZZOLO *et al.*, 2002; RUBIO-
1261 GASTÉLUM *et al.*, 2014). La variación de proteína en la hemolinfa puede ser utilizada como un
1262 buen indicador del estado fisiológico de los crustáceos (VELURTAS *et al.*, 2011). RACOTTA y
1263 PALACIOS (1998) reportaron la disminución de los niveles de proteína en la hemolinfa
1264 durante periodos de estrés agudo en el camarón blanco del Pacífico, según LORENZON *et al.*
1265 (2011) los niveles de proteína en la hemolinfa se pueden utilizar como indicadores de las
1266 características adaptativas de los animales, así que podríamos suponer que los niveles de
1267 proteína mayores para los camarones alimentados con microalga permitieron mayor
1268 adaptabilidad a los altos niveles de nitrogenados y por lo tanto permitir un mayor crecimiento
1269 que los camarones alimentados con balanceado.

1270 El estrés en crustáceos normalmente provoca una reducción pronunciada de proteína en la
1271 hemolinfa, disminuyendo la concentración de hemocianina en la hemolinfa y probablemente
1272 menores concentraciones de proteínas inmunes específicas (PERAZZOLO *et al.*, 2002). LIN *et al.*
1273 (2015) estudiaron los efectos del *Vibrio alginolyticus* y el virus de la mancha blanca en los
1274 camarones criados en diferentes densidades, y observaron la disminución de las proteínas en la
1275 hemolinfa con el aumento de densidad de siembra. Esta disminución se expresa con una menor

1276 efectividad de la respuesta inmunologica según aumentaba la densidad de siembra de
1277 camarones en el sistema de producción. Sin embargo, YANG *et al.* (2015) obtuvieron mayores
1278 niveles de proteína en la hemolinfa de camarones alimentados con dietas suplementadas con
1279 proteína vegetal de la *Yucca schidigera*. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos
1280 durante el presente experimento, probablemente porque en este ensayo se suplementó como
1281 alimento *A. platensis*, la cual tiene efectos inmunoestimulantes que facilita el desarrollo normal
1282 de los animales, incluso bajo condiciones de estrés, provocadas por la alta densidad de cultivo y
1283 altos valores de concentración de amonio.

1284 Según PASCUAL *et al.* (2004), el hecho de utilizar alimentos con bajo contenido protéico
1285 durante la producción de *L. vannamei* provoca aumento de la tasa de respiración metabólica,
1286 reducción del crecimiento, de la capacidad inmunologica, de la concentración de hemocitos y la
1287 capacidad fagocitica de los mismos. Estos resultados alcanzados corroboran los resultados de
1288 experimentos anteriores (ANAND *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015). Entonces la inclusión de
1289 alimentos con alto contenido de proteína ayuda a que los niveles de proteína en la hemolinfa
1290 sean mayores.

1291 Los conteos de hemocitos hialinos (Hh) y hemocitos granulados (Hg) también fueron diferentes
1292 estadísticamente entre los tratamientos, siendo mayor el número de Hg para los animales que
1293 recibieron suplementación de *A. platensis*. Los Hg son las células responsables de originar y
1294 almacenar peneidinas (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000) además de encargarse de la actividad de
1295 fagocitosis de microorganismos, formación de nódulos y la creación de moléculas tóxicas y
1296 microbicidas (HOSE *et al.*, 1990; GARGIONI y BARRACCO, 1998; VAN DE BRAAK *et al.*, 2002;
1297 BARRACCO *et al.*, 2008). La cantidad de hemocitos encontrados en la hemolinfa puede variar
1298 en respuesta a infecciones, estrés ambiental y actividad endócrina durante los procesos de
1299 muda (SMITH y RATCLIFFE, 1978; PERSSON *et al.*, 1987; SMITH y JOHNSTON, 1992;
1300 JOHANSSON *et al.*, 2000). LIU y CHEN (2004) percibieron la restricción de la respuesta inmune
1301 del camarón blanco cuando este fue expuesto a altas concentraciones de amonio (5-20 NH₄⁺ mg
1302 L⁻¹), estos investigadores encontraron reducción en la capacidad fagocitica de los hemocitos de
1303 los camarones en condiciones de mayor concentración de amonio, pero no se obtuvieron
1304 diferencias en la cantidad de hemocitos granulares.

1305 La situación enfrentada durante el período experimental de altos niveles en la concentración de
1306 amonio en el agua y la alta densidad de siembra de camarones provocó este alto valor de Hg, ya
1307 estos datos coincidieron con los resultados obtenidos por TAYAG *et al.* (2010) y LIN *et al.* (2010),

1308 donde aumentó el número de Hg en camarones sumergidos en agua utilizada para cultivar *A.*
1309 *platensis* y posteriormente enfrentados a diferentes tipos de estrés, infección de *Vibrio*
1310 *alginolyticus* y estrés de pH respectivamente.

1311 Frente a condiciones específicas, como la contaminación por metales o factores ambientales
1312 adversos, ocurre un aumento de la apoptosis en los organismos (OBERHAMMER, 1993). La
1313 apoptosis es el principal proceso de repuesta inmunológica porque libera espacio al retirar
1314 células dañadas, infectadas y senescentes que no han sido inflamadas para poder mantenerla
1315 homeostasis inmunológica (TERAHARA y TAKAHASHI, 2008). Los valores de apoptosis
1316 durante este experimento fueron mayores en el tratamiento donde se suplementó microalga,
1317 indicando que estos camarones estaban más aptos inmunológicamente bajo las condiciones
1318 límites ocurridas durante este experimento que los alimentados únicamente con balanceado.
1319 Estos resultados vienen a confirmar lo observado al respecto de la concentración de hemocitos en
1320 este estudio. CHANG *et al.* (2009), XIAN *et al.* (2012) FAN *et al.* (2013) y LI *et al.* (2014) también
1321 encontraron valores altos de apoptosis en grupos de camarones que enfrentaron altas
1322 variaciones de temperatura, siendo la apoptosis la respuesta propia del sistema de defensa del
1323 camarón para disminuir los efectos ocasionados por diferentes situaciones extremas de cultivo.
1324 Sin embargo, MACIAS-SANCHO *et al.* (2014) encontraron reducción de los niveles apoptóticos
1325 para los camarones alimentados con dietas con altos niveles de sustitución de harina de
1326 pescado por harina de *A. platensis*, pero hay que destacar que estos valores bajos de apoptosis en
1327 la hemolinfa ocurrieron bajo situaciones de cultivo óptimas. Valores altos de apoptosis pueden
1328 estar conectados a la velocidad de respuesta frente a posibles invasiones o situaciones de estrés.
1329 Los animales que reciben alimentación con dietas ricas en inmunostimulantes evitan la muerte
1330 porque consiguen la renovación continua de los elementos encargados de defensa en situaciones
1331 límite como la alta densidad de cultivo.

1332 CONCLUSIONES

1333 Por los resultados obtenidos al finalizar este ensayo podemos inferir que la especie de camarón
1334 *L. vannamei* alimentada con microalga *A. platensis* como suplemento mostró mejor desempeño.
1335 Refiriéndonos a los resultados del sistema inmunológico obtenido concluimos que los
1336 camarones muestran mejoras en los parámetros inmunológicos cuando son suplementados con
1337 microalga *A. platensis*. Entonces es posible afirmar que el camarón blanco *L. vannamei* que recibe
1338 microalga *A. platensis* como suplemento alimenticio se encontraba mejor alimentado y más

1339 preparado inmunologicamente que camarones alimentados con balanceados comerciales
1340 comunes.

1341 AGRADECIMIENTOS

1342 Los autores estan agradecidos al Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento
1343 (MAPA), Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) y a la Coordinación
1344 de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES). M.B. Tesser, L.H. Poersch, L.A.
1345 Romano y W.Wasielesky que recibieron beca de investigación de productividad CNPq.

1346 REFERENCIAS

1347 ABDEL-TAWWAB, M. y AHMAD, M.H. 2009 Live *Spirulina (Arthrospiraplatensis)* as a growth
1348 and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic
1349 *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9): 1037-1046.

1350 AMINOT, A. y CHAUSSEPIED, M. 1983 Manuel des analyses chimiques en milieu marin.
1351 CNEXO, Brest. 379 p.

1352 ANAND, P.S.S.; KOHLI, M.P.; DAM ROY, S.; SUNDARAY, J.K.; KUMAR, S.; SINHA, A.;
1353 PAILAN, G.H. 2015 Effect of dietary supplementation of periphyton on growth, immune
1354 response and metabolic enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 46(9): 2277-
1355 2288.

1356 APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1998 En: *Standard Methods for the*
1357 *Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. Washington, DC. 1193 p.

1358 ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 2000 *Official Methods*
1359 *of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists International*, 16th ed. AOAC
1360 International, Arlington, VA, USA.

1361 BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R.D. 2008 Inmunología del Camarón. En:
1362 MORALES, V. y CUÉLLAR-ANJEL, J. *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones*
1363 *Penaeidos*. Programa CYTED, Panamá. 169-264.

1364 BELAY, A.; KATO, T.; OTA, Y. 1996 *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal
1365 feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8(4-5): 303-311.

- 1366 BENDSCHNEIDER, K. y ROBINSON, R.J. 1952. A new spectrophotometric method for the
1367 determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine. Research*, 11: 87-96.
- 1368 BRADFORD, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
1369 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical. Biochemistry*, 72(1-
1370 2): 248-254.
- 1371 CEDEÑO, R.; VALENZUELA, E.; RODRÍGUEZ, J. 2000. Efectores inmunitarios como
1372 marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. *Panorama.*
1373 *Acuícola*, 5, 42- 44.
- 1374 CHANG, C. C.; YEH, M. S.; CHENG, W. 2009 Cold shock-induced norepinephrine triggers
1375 apoptosis of haemocytes via caspase-3 in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish*
1376 *Immunology*, 27(6): 695-700.
- 1377 CHARRIAUT-MARLANGUE, C. y BEN-ARI, Y. 1995 A cautionary note on the use of the
1378 TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 7(1): 61-64.
- 1379 CHENG, W.; WANG, L.U.; CHEN, J.C. 2005 Effect of water temperature on the immune
1380 response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 250: 592-601.
- 1381 CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. 2003 Water quality control using
1382 *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220(1): 355-366.
- 1383 CRUZ-SUÁREZ, L.E.; LEÓN, A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-PEÑA, G.; MOLL, B.;
1384 RICQUE MARIE, D. 2010 Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to diminish the
1385 need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301(1): 64-68.
- 1386 DALLE ZOTTE, A.; CULLERE, M.; SARTORI, A.; SZENDRŐ, Z.; KOVÁCS, M. GIACCONE, V.;
1387 DAL BOSCO, A. 2014 Dietary *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*)
1388 supplementation to growing rabbits: Effects on raw and cooked meat quality, nutrient true
1389 retention and oxidative stability. *Meat science*, 98(2): 94-103.
- 1390 DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.;
1391 BACHÈRE, E. 2000 Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are
1392 produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of*
1393 *Cell Science*, 113(3): 461-469.
- 1394 FAN, L. F.; WANG, A.L.; WU, Y. X. 2013 Comparative proteomic identification of the hemocyte
1395 response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Proteomics* 80: 196-206.

- 1396 FURTADO, P.S.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY, W. 2011 Effect of calcium hydroxide,
1397 carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp
1398 *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321(1): 130-135.
- 1399 GAMBOA-DELGADO, J. 2014 Nutritional role of natural productivity and formulated feed in
1400 semi-intensive shrimp farming as indicated by natural stable isotopes. *Reviews in Aquaculture*,
1401 6(1): 36-47.
- 1402 GARGIONI, R.y BARRACCO, M. A. 1998 Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium*
1403 *rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *Journal of Morphology*, 236(3):
1404 209-221.
- 1405 GHARIBI, M. R.; ATASHBAR, B.; AGH, N.; NEMATOLLAHI, M.; ARAMLI, M. S.; NOORI, A.
1406 2015 Effect of concentration of the microalga *Dunaliella tertiolecta* on survival and growth of
1407 fairy shrimp, *Phallocryptus spinosa* Milne Edwards, 1840 (Crustacea: Anostraca). *Aquaculture*
1408 *Research*, 47: 2976-2982
- 1409 GE, H.; LI, J.; CHANG, Z.; CHEN, P.; SHEN, M.; ZHAO, F. 2016 Effect of microalgae with
1410 semicontinuous harvesting on water quality and zootechnical performance of white shrimp
- 1411 GUILLARD, R. R. 1975 Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of*
1412 *marine invertebrate animals*. Springer US. p. 29-60.
- 1413 HENRIKSON, R. 2009 Earth food *Spirulina*: How this remarkable Blue-green algae can
1414 transform your health and our planet. Enterprises Inc, Laguna Beach.USA. 180p.
- 1415 HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. 1990 A decapod hemocyte classification scheme
1416 integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178(1): 33-45.
- 1417 JOHANSSON, M. W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. 2000
1418 Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1): 45-52.
- 1419 JORY, D.E.; CABRERA, T.R.; DUGGER, D.M.; FEGAN, D.; LEE, P.G.; LAWRENCE, A.L.;
1420 JACKSON, C.J.; MCINTOSH, R.P.; CASTAÑEDA, J. 2001 A global review of shrimp feed
1421 management: Status and perspectives. En: BROWDY, C.L. y JORY, D.E. *The New Wave*,
1422 *Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture*. Baton Rouge: The
1423 World Aquaculture Society. p.104-152.
- 1424 KUMAR, S.; ANAND, P. S.; RAVICHANDRAN, P.; PANIGRAHI, A.; DAYAL, J. S; RAJA, R.
1425 DEO, A.D.; GHOSHAL, T. K.; PONNIAH, A. G. 2015 Effect of periphyton on microbial

1426 dynamics, immune responses and growth performance in black tiger shrimp *Penaeus monodon*
1427 Fabricius, 1798. *Indian Journal. Fisheries*, 62(3): 67-74.

1428 LI, B.; XIAN, J. A.; GUO, H.; WANG, A. L.; MIAO, Y.T.; YE, J.M.; YE, C-X.; LIAO, S. A. 2014
1429 Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.
1430 *Aquaculture international*, 22(2): 761-774.

1431 LIN, Y. C.; TAYAG, C. M.; HUANG, C. L.; TSUI, W. C.; CHEN, J. C. 2010 White shrimp
1432 *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier
1433 recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & shellfish*
1434 *immunology*, 29(6): 1092-1098.

1435 LIN, Y. C.; CHEN, J. C.; CHEN, Y. Y.; YEH, ST.; CHEN, L. L.; HUANG, C. L.; HSIEH, J.F.; LI, C.
1436 C. 2015 Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and
1437 resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & shellfish*
1438 *immunology*, 45(1): 104-111.

1439 LIU, C. H.y CHEN, J. C. 2004 Effect of ammonia on the immune response of white shrimp
1440 *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*,
1441 16(3): 321-334.

1442 LORENZON, S.; DE GUARRINI, S.; SMITH, V. J.; FERRERO, E. A.; 1999 Effects of LPS injection
1443 on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish & shellfish immunology*, 9(1): 31-50.

1444 LORENZON, S.; MARTINIS, M.; FERRERO, E. A. 2011 Ecological relevance of hemolymph total
1445 protein concentration in seven unrelated crustacean species from different habitats measured
1446 predictively by a density-salinity refractometer. *Journal of marine Biology*, 2011.

1447 MACIAS-SANCHO, J.; POERSCH, L. H. S.; BAUER, W.; ROMANO, L. A.; WASIELESKY JR,
1448 W.; TESSER, M. B. 2014 Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical
1449 diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*,
1450 426-427: 120-125.

1451 TAYAG, C. M.; LIN, Y. C.; LI, C. C.; LIOU, C. H.; CHEN, J. C. 2010 Administration of the hot-
1452 water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus*
1453 *vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 28(5): 764-773.

1454 TERAHARA, K.y TAKAHASHI, K. G. 2008 Mechanisms and immunological roles of apoptosis
1455 in molluscs. *Current pharmaceutical design*, 14(2): 131-137.

1456 OBERHAMMER, F.; WILSON, J. W.; DIVE, C.; MORRIS, I. D.; HICKMAN, J. A.; WAKELING,
1457 A. E.; WALKER, P. R.; SIKORSKA, M. 1993 Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA
1458 to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The*
1459 *EMBO journal*, 12(9): 3679.

1460 PALLAORO, M. F.; VIEIRA, F. N.; HAYASHI, L. 2016 *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-
1461 feed for Pacific white shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 28(6): 3659-3665.

1462 PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ, A.; VARGAS-ALBORES, F.; LEMOULLAC, G.;
1463 ROSAS, C. 2003 Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus*
1464 *setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218(1), 637-650.

1465 PASCUAL, C.; ZENTENO, E.; CUZON, G.; SÁNCHEZ, A.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.;
1466 SUAREZ, J.; MALDONADO, T.; ROSAS, C. 2004 *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic
1467 balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236(1): 431-450.

1468 PASCUAL, C., SÁNCHEZ, A., ZENTENO, E., CUZON, G., GABRIELA, G., BRITO, R.,
1469 GELABERT, R., HIDALGO, E; ROSAS, C. 2006 Biochemical, physiological, and immunological
1470 changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251(2), 416-429.

1471 PEÑA-RODRÍGUEZ, A.; LEÓN, A.; MOLL, B.; TAPIA-SALAZAR, M.; NIETO-LÓPEZ, M. G.;
1472 VILLARREAL- CIVERA-CERECEDO CAVAZOS, D. A.; RICQUE-MARIE, D.; CRUZ-
1473 SUÁREZ, L. E. 2010 Uso de *Ulva clathrata* en la nutrición del camarón blanco: revisión. En:
1474 CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLEVERA-NOVA, M.A.;
1475 CIVERA CERECEDO R. *Avances en nutrición acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León,
1476 Monterrey. pp.700-712.

1477 PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M. A. 2002 Evaluation of some
1478 hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to
1479 environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214(1): 19-33.

1480 PÉREZ-JAR, L.; RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; RAMOS, L.; GUERRA-BORREGO, Y.; RACOTTA, I.
1481 S. 2006 Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern
1482 white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity.
1483 *Aquaculture*, 252(2), 591-597.

- 1484 PERSSON, M.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. 1987 The influence of haemocyte number on
1485 the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus
1486 *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases*, 10(6): 471-477.
- 1487 RACOTTA, I. S. y PALACIOS, E. 1998 Hemolymph metabolic variables in response to
1488 experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the*
1489 *World Aquaculture Society*, 29(3), 351-356.
- 1490 RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; ESPINOSA, G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; GOLLAS-GALVÁN, T.;
1491 MARRERO, J.; BORRELL, Y.; ALONSO, M. E.; BÉCQUER, U. ALONSO M. 2008 Effects of
1492 *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern
1493 white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274(1):118-125.
- 1494 RUBIO-GASTÉLUM, D.; VALENZUELA-QUIÑÓNEZ, W.; PARRA-BRACAMONTE, G. M.;
1495 SANTAMARIA-MIRANDA, A. 2014. Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño
1496 productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en
1497 laboratorio. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(3), 601-606.
- 1498 SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, I.; CASAS-VALDEZ, M. 2012 The stable isotope of
1499 nitrogen in an experimental culture of *Ulva spp.* and its assimilation in the nutrition of white
1500 shrimp *Litopenaeus vannamei*, Baja California Sur, Mexico. *Journal of applied phycology*, 24(3), 507-
1501 511.
- 1502 SMITH, V. J. y RATCLIFFE, N.A. 1978 Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*
1503 (L.); clearance and distribution of injected particles. *Journal of the Marine Biological Association of*
1504 *the United Kingdom*, 58(02), 89-102.
- 1505 SMITH, V. J. y JOHNSTON, P. A. 1992 Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the
1506 common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-C. Toxicology and*
1507 *Pharmacology*, 101(3): 641-649.
- 1508 SOMBATJINDA, S.; WANTAWIN, C.; TECHKARNJANARUK, S.;
1509 WITHYACHUMNARNKUL, B.; RUENGJITCHATCHAWALYA, M. 2014 Water quality control
1510 in a closed re-circulating system of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae co-
1511 cultured with immobilized *Spirulina* mat. *Aquaculture international*, 22(3): 1181-1195.
- 1512 UNESCO. 1983 Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual
1513 and Guides, 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

1514 UTHAYAKUMAR, V.; VIDHYA, K.; CHANDIRASEKAR, R.; SREEDEVI, P. R.; MOHAN, K.;
1515 JAYAKUMAR, R.; SENTHILKUMAR, D. Y VENKATACHALAM, R. 2015 Effect of *Spirulina*
1516 *platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Spirogyra maxima* on Population Growth, Egg Production and
1517 Nutritional Profiles in *Thermocyclops hyalinus*. *Global Veterinaria*, 15 (6): 554-563.

1518 VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; TAVERNE, N. V.; VAN MUISWINKEL,
1519 W. B.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W. P. W. 2002 The roles of haemocytes and
1520 the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish*
1521 *& shellfish immunology*, 13(4): 293-309.

1522 VAN WYK, P.y SCARPA, J. 1999 Water quality and management. En: VAN WYK, P.;
1523 DAVISHODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K.L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J.,
1524 *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida: Department of Agriculture and
1525 Consumer Services, Tallahassee, pp. 128-138.

1526 VELURTAS, S. M.; DÍAZ, A. C.; FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A. V.; FENUCCI, J. L. 2011 Influence
1527 of dietary starch and cellulose levels on the metabolic profile and apparent digestibility in
1528 penaeoid shrimp/ Influencia del nivel de almidon y celulosa en la dieta sobre el perfil
1529 metabolico y digestibilidad aparente en camarones penaeideos. *Latin American Journal of Aquatic*
1530 *Research*, 39(2): 214-224.

1531 WANG, W. y ZHANG, X. 2008 Comparison of antiviral efficiency of immune responses in
1532 shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 25(5): 522-527.

1533 WANG, X. W.y WANG, J. X. 2013 Diversity and multiple functions of lectins in shrimp
1534 immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1): 27-38.

1535 WATANUKI, H.; OTA, K.; MALINA, A. C.; TASSAKKA, A. R.; KATO, T.; SAKAI, M. 2006
1536 Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*,
1537 258(1): 157-163.

1538 WEIBEL ER. 1980 *Stereological Methods*, 2. Academic, London 253-257.

1539 XIAN, J. A.; WANG, A. L.; HAO, X. M.; MIAO, Y. T.; LI, B. YE, C. X. LIAO, S. A. 2012 In vitro
1540 toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeusmonodon*, using flow cytometric
1541 analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2): 75-79.

- 1542 YANG, Q. H.; TAN, B. P.; DONG, X. H.; CHI, S. Y.; LIU, H. Y. 2015 Effects of different levels of
1543 *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp
1544 (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. *Aquaculture*, 439: 39-44.
- 1545 ZHANG, B.; LIN, W.; WANG, Y.; XU, R. 2010. Effects of artificial substrates on growth, spatial
1546 distribution and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei* in the intensive culture.
1547 *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(4): 491-497.

1548

CAPÍTULO 3

1549 Dietas experimentais com substituição de farinha de peixe por farinha de *Arthrospira*
1550 *platensis* para juvenis de *Litopenaeus vannamei*: efeitos no crescimento, coloração, apoptose e
1551 peroxidação lipídica.

1552 **Artigo formatado para submissão em revista: Aquaculture**

1553 **Observação:** *foi incluído um resumo expandido em português*

1554 **RESUMO EXPANDIDO**

1555 A utilização de microalgas como principal ingrediente de rações balanceadas para aquicultura
 1556 tem aumentando nos últimos anos. A substituição de farinha de peixe por farinha de
 1557 microalga *Arthrospira platensis* pode minimizar o uso da proteína de origem animal como
 1558 principal componente das rações utilizadas. A microalga não só apresenta um elevado teor de
 1559 proteína, como também outros compostos importantes tais como os carotenóides e
 1560 ficobiliproteínas, os quais são benéficos para a saúde e incrementam a pigmentação dos
 1561 camarões proporcionando maior visibilidade e atratividade para os consumidores. O
 1562 experimento foi realizado durante 28 dias visando avaliar a influência de seis dietas com
 1563 diferentes níveis de inclusão de microalga *Arthrospira platensis* como fonte principal de
 1564 proteína (0%, 5%, 10%, 25%, 50% e 75%) no desempenho, conteúdo de carotenóides totais,
 1565 coloração, sistema imunológico e peroxidação lipídica de juvenis de *Litopenaeus vannamei*.
 1566 Foram utilizados 18 tanques plásticos de 250 litros cada, com densidade de estocagem de 120
 1567 cam/ m². Ao longo da fase experimental foram medidos os parâmetros de qualidade da água
 1568 como concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, concentração de amônia, nitrito,
 1569 nitrato e fosfato. Renovações diárias de água (33%) foram realizadas ao longo do período
 1570 experimental para manter os parâmetros de qualidade de água dentro dos padrões normais
 1571 associados para garantir o bom desenvolvimento de *L. vannamei*. No final do experimento os
 1572 camarões foram contabilizados e pesados individualmente por tratamento. Grupos de
 1573 camarões foram selecionados aleatoriamente para determinar a coloração, concentração de
 1574 carotenóides totais e peroxidação lipídica de os diferentes tratamentos. Diferenças
 1575 significativas no peso final, sobrevivência, fator de conversão alimentar, índice de apoptose,
 1576 coloração, concentração de carotenóides totais e peroxidação lipídica foram registradas para
 1577 os grupos de camarões alimentados com altos níveis (25%, 50% e 75%) de *A. platensis*. Esses
 1578 dados estão apresentados nas seguintes tabelas.

1579 Tabela 8: Desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* alimentado com diferentes níveis
 1580 de substituição de farinha de peixe por farinha de microalga *A. platensis*. PI (peso inicial); PF
 1581 (peso final); GPS (ganho em peso semanal); Sobrevivência (Sobre); FCA (Fator de conversão
 1582 alimentar); Percentual de apoptose de hemócitos (Apoptoses) (n=5).

	0%	5%	10%	25%	50%	75%
PI (g)	2,9 ± 0,49	3,0 ± 0,32	2,8 ± 0,45	2,6 ± 0,42	2,7 ± 0,22	2,6 ± 0,35
PF (g)	7,22 ± 0,18 c	6,89 ± 0,18 c	7,11 ± 0,29 c	7,88 ± 0,28 b	8,34 ± 0,26 a	8,03 ± 0,18 ab

GPS (g)	0,96 ± 0,02 bc	0,89 ± 0,07 c	0,90 ± 0,03 bc	1,03 ± 0,01 ab	1,14 ± 0,002 a	1,12 ± 0,01 a
Sobre (%)	92,86 ± 0,01 b	96,03 ± 2,24 ab	97,62 ± 2,38 ab	98,41 ± 1,37 a	100 ± 0,00 a	95,24 ± 2,38 ab
FCA	2,47 ± 0,05 b	2,59 ± 0,18 b	2,49 ± 0,09 b	2,16 ± 0,03 a	1,98 ± 0,06 a	2,07 ± 0,03 a
Apoptoses (%)	0,81 ± 0,10a	0,50 ± 0,11b	0,19 ± 0,08b	0,19 ± 0,09b	0,23 ± 0,08b	0,28 ± 0,05b

1583 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05)

1584 Tabela 9. Parâmetros de coloração e concentração de carotenóides totais. Brilho (L);
 1585 Vermelho (a); Amarelo (b); Chorma ($C = (a^2 + b^2)^{1/2}$); Tonalidade ($H = \arctan(b/a)$), para
 1586 músculo de camarão cozido, resultados expressos como média e desvio padrão (n=5).
 1587 Concentração de carotenóides totais nas dietas (TCC diets); Concentração de carotenóides
 1588 totais no músculo de camarão alimentados com diferentes níveis de *A. platensis* (TCC múscl),
 1589 dados expressos como média e desvio padrão ($\mu\text{g/g}$) (n=6).

	0%	5%	10%	25%	50%	75%
L	61,81 ± 7,95 a	63,05 ± 9,52 a	57,26 ± 9,02 b	56,37 ± 9,15 bc	54,44 ± 9,16 c	54,60 ± 8,30 c
a	14,49 ± 3,31 b	10,32 ± 2,42 c	15,44 ± 3,57 b	21,14 ± 3,86 a	21,83 ± 2,99 a	20,52 ± 3,98 a
b	22,86 ± 1,12 c	22,75 ± 3,74 c	23,87 ± 3,29 bc	25,95 ± 4,53 ab	25,72 ± 4,00 ab	26,62 ± 2,13 a
C	26,90 ± 0,70 bc	24,72 ± 0,53 b	28,12 ± 0,95 b	33,46 ± 1,02 a	33,86 ± 0,61 a	33,92 ± 0,43 a
H	58,74 ± 1,52 b	67,13 ± 0,85 a	58,58 ± 1,32 b	50,85 ± 0,45 c	49,48 ± 0,63 c	51,88 ± 1,06 c
TCC (diets)	0,065 ± 0,005c	0,183 ± 0,01c	0,29 ± 0,002c	1,23 ± 0,272 b	1,68 ± 0,001 ab	2,32 ± 0,122 a
TCC(muscle)	0,041 ± 0,01d	0,044 ± 0,01dc	0,061 ± 0,02bc	0,078 ± 0,01 b	0,127 ± 0,02a	0,113 ± 0,02 a

1590 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05)

1591 Tabela 10. Parâmetros de dano oxidativo no hepatopâncreas e músculo de camarões
 1592 alimentados com diferentes níveis de *A. platensis*. Concentração de Malondialdeído por
 1593 grama de tecido (MDA); Concentração de grupos tiol não protéicos por grama de proteína
 1594 (NPSH), dados expressos como média e desvio padrão (n=6).

	0%	5%	10%	25%	50%	75%
Hepatopâncreas						
MDA	0,15 ± 0,01 b	0,44 ± 0,07 ab	0,47 ± 0,09 ab	0,75 ± 0,25 a	0,43 ± 0,22 ab	0,54 ± 0,08 ab
NPSH	24,16 ± 4,24 b	26,43 ± 5,61 b	21,7 ± 8,75 b	22,13 ± 7,21 ab	66,47 ± 14,36 a	38,62 ± 8,94 b
Músculo						
MDA	0,135 ± 0,003 ^a	0,134 ± 0,007 ^a	0,132 ± 0,003a	0,176 ± 0,021 b	0,189 ± 0,021b	0,197 ± 0,008 b
NPSH	40,79 ± 5,72 ab	23,27 ± 7,04 a	25,59 ± 3,69 a	30,37 ± 5,82 ab	41,98 ± 7,68 b	43,07 ± 9,85 b

1595 Diferentes letras na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05)

1596 Os resultados confirmaram que a *A. platensis* nas dietas consegue melhorar o crescimento,
 1597 coloração, índice de apoptose e influenciar positivamente o estado oxidativo do camarão
 1598 branco *Litopenaeus vannamei*.

1599 *Palavras chave: coloração, microalga, desempenho, peroxidação.*

ANEXO 2

1600 Experimental diets with replacement of fish meal by *Arthrospira platensis* meal in juveniles
1601 of *Litopenaeus vannamei*: effect in growth, color and lipid peroxidation.

1602 Joaquin Macias-Sancho, Luis Alberto Romano, Wilson Wasielesky, José María Monserrat,
1603 Marcelo Borges Tesser, Luís Henrique Poersch.

1604 Federal University of Rio Grande- FURG. Rua do Hotel 2, Cassino, Rio Grande, RS. CEP:
1605 96210-030

1606 Email address: joaquinmaciassancho@gmail.com

1607 Telephone: +55 53 32361685

1608 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5993-9827>

1609 a Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande -FURG,
1610 Rio Grande, RS, Brazil

1611 b Laboratório de Patologia e Imunologia de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia
1612 (IO), Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

1613 c Laboratório de Carcinocultura, Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio
1614 Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

1615 d Laboratorio de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de
1616 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

1617 e Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia (IO),
1618 Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

1619 f Instituto de Ciências Biológicas (ICB), FURG, Rio Grande, RS, Brazil

1620 Abstract

1621 The use of microalgae as a main compound in balanced food use is increasing in the last
1622 years. Particularly, fish meal substitution by *Arthrospira platensis* might minimize the
1623 protein from animal origin as a principal ingredient in diets used in aquaculture.
1624 Microalgae not just have a promising protein profile; also contain other important
1625 compounds as carotenoids and phycobiliproteins that are beneficial to provide health.
1626 Other molecules as pigments can give more visibility and attractiveness to the final
1627 aquaculture products. In present study, a trial of 28 days was performed and assessed
1628 the influence of six diets with different inclusion levels of microalgae *A. platensis* as the
1629 main protein source (0%, 5%, 10%, 25%, 50% and 75%) in juvenile shrimps
1630 *Litopenaeus vannamei* development, total carotenoid content, coloration,
1631 immunological system and lipid peroxidation reared in clear water. At the end of the
1632 experiment, individual weights were measured and a group of shrimps from each
1633 treatment was randomly selected to determine the coloration, carotenoids content and
1634 oxidative damage in hepatopancreas and muscle for the different treatments. Significant
1635 differences of these variables were assessed in the groups that were fed with higher
1636 levels (25%, 50% and 75%) of *A. platensis*. The results confirmed that *A. platensis* can
1637 improve the performance, color, immunological response and allow the lipid
1638 peroxidation instead of the loss of muscle protein in white shrimp *Litopenaeus*
1639 *vannamei*.

1640 *Keywords: color, microalgae, shrimp-performance, lipid peroxidation.*

1641 1. Introduction

1642 Historically, fishmeal is the preferred protein source for the species in captivity
1643 because its nutrient profile satisfies their nutritional requirements. However, to support
1644 a sustainable and growing aquaculture production, the utilization of materials from
1645 different sources is necessary (Bendiksen, et al., 2011). The world fish consumption is
1646 raising and the aquaculture is the unique option to supply the human demand for
1647 seafood. In that sense, one of the main challenges of aquaculture is the generation of
1648 different diets containing low or zero fishmeal inclusion using alternative protein
1649 sources.

1650 In fact, macroalgae, microalgae and yeast have been included in aquaculture
1651 feeds because of their capacity to improve growth and immune system in aquatic
1652 organisms (Macias-Sancho, et al., 2014; Gamboa-Delgado, et al., 2016). The high
1653 protein content of microalgae *Arthrospira platensis* is one of their main properties to be
1654 considered as a promising protein source (Scaria *et al.*, 2000; James *et al.*, 2006).
1655 Sasson (1997) suggested that this cyanobacteria is practically fully digested due to the
1656 absence of cellulose in their cell walls. This may be the reason why more than 85 % of
1657 its proteins can be digested and assimilated after 18 h (Sasson, 1997; Khanzadeh *et al.*,
1658 2016).

1659 *A. platensis* has been described to present bioactive compounds that exert
1660 antioxidant and immunostimulation properties (Gershwin and Belay, 2007; Martín-
1661 Palma *et al.*, 2015). For example, Sayed *et al.* (2017) evaluated the dietary inclusion of
1662 this microalgae species and confirmed that it can be used as a promising protective
1663 agent to counteract several conditions and factors that promote oxidative stress as lead,
1664 the most common heavy metal contaminants in the marine system. Some studies also
1665 confirmed the involvement of compounds from *A. platensis* in immunostimulation
1666 (Macias-Sancho *et al.*, 2014) and antioxidant and hepatoprotective effects (Jamil *et al.*,
1667 2015; Sayed *et al.*, 2017). The capacity of the different microalgae to improve the
1668 immunological system is attributed to their molecular contents, including
1669 polysaccharides, lignin, enzymes, PUFAs, peptides, polyphenols and alcohol (de Jesus
1670 Raposo *et al.*, 2016). On the other hand, *A. platensis* in certain concentrations might
1671 cause differences in rabbit meat composition due to the presence of phycocyanin, which
1672 confers a pro-oxidant effect (Macari *et al.*, 2011).

1673 Carotenoids of diverse aquatic plants also contribute to the wide hue of blue,
1674 green, purple, brown and reddish colors in fish, insect, bird and crustacean species
1675 (Shahidi and Brown, 1998, Ostermeyer *et al.*, 2014). *Spirulina* is considered a rich fount
1676 of carotenoids, especially β -carotene (Ambrosi, et al., 2009) and zeaxanthin (Koru,
1677 2012; Yu *et al.*, 2012). Some studies also pointed out the effects of *A. platensis* in
1678 coloration of the different fish species (James *et al.* 2006; Temouri *et al.*, 2013;
1679 Khanzadeh *et al.* 2016). In the case of shrimps, consumers revealed preferential
1680 consumption of shrimps with intense red color (Parisenti *et al.*, 2011b). According to
1681 Temouri *et al.* (2013) there is a positive correlation between the redness coloration in

1682 rainbow trout fillets and blood carotenoid concentrations, those high levels of
1683 carotenoids were achieved by the inclusion of *A. platensis* meal in trout diets.

1684 Recently, Macias-Sancho et al (2014) described that *L. vannamei* could be fed
1685 with diets with 75% substitution of fishmeal by *Spirulina* without growth impairment.
1686 Moreover, the immune system was enhanced. Pakravan et al. (2017) showed that *L.*
1687 *vannamei* fed with *Spirulina* presented higher survival rates after a hypoxia stress tests
1688 compared to the shrimp fed with *Spirulina* free diets. However, as far as we know, no
1689 data are available about the effects of the *Spirulina* on *L. vannamei* muscle coloration
1690 and oxidative damage.

1691 2. Materials and methods

1692 2.1. Shrimp source and experimental designs

1693 The experiment lasted 28 days and it was conducted in 18 plastic tanks of 250 L
1694 (150 L of useful volume) and 0.49 m² of surface. Juvenile shrimps with 2.6 ± 0.8 g
1695 (mean ± 1 SD) were stocked using 42 shrimps per experimental unit. The water
1696 renovation rate per tank was 50 L per day. The tanks also were siphoned daily to
1697 eliminate uneaten feed and molts. Each treatment, 0%, 5%, 10% 25%, 50% and 75%
1698 replacement level of fish meal by *A. platensis* meal, was run in triplicate, being the
1699 shrimps randomly distributed among the experimental tanks. The shrimps were fed
1700 three times per day at 8:00, 14:00 and 18:00 h. The input of feed was calculated
1701 according to Jory et al. (2001), represented by the 8.0% of biomass each tank.

1702 Dissolved oxygen and temperature were measured daily with a digital oximeter
1703 (YSI 55, Yellow Springs, OH, USA) and the salinity was determined daily using an
1704 optical refractometer (RTS-101, Atago U.S., Bellevue, WA, USA). The pH was
1705 measured every two days using a digital pH meter (pH 100 Ecosense YSI, Yellow
1706 Springs, OH, USA). Water samples were taken three times for a week to measure the
1707 total concentrations of ammonia (UNESCO, 1983), nitrite (Bendschneider and
1708 Robinson, 1952), nitrate (Aminot and Chaussepied, 1983) and alkalinity (APHA 1998).
1709 A photoperiod of 12: 12 (light: dark) was maintained throughout the experimental
1710 period.

1711 2.2 Diets preparation

1712 Six isocaloric and isoenergetic diets contained 33% of protein and 7.0% of lipids
 1713 were formulated. The control diet was formulated with fishmeal as the main source
 1714 protein, and the other five experimental diets were formulated based on control diet
 1715 replacing levels of fish meal by *A. platensis* (5.0%, 10%, 25%, 50% and 75%) and
 1716 according with diets used by Macias- Sancho *et al.* (2014). The total amino acid
 1717 contents of the main diets ingredients diets were determined by Near Infrared
 1718 Reflectance Spectroscopy (NIRS) method – Evonik (São Paulo, SP, Brazil) according to
 1719 the methodology by Figueredo- Silva *et al.* (2015) to calculate the methionine
 1720 necessary to achieve the levels indicated by Huo *et al.* (2010) were reached by the
 1721 addition of MetAmino ®DL-methionine, feed grade 99% (Evonik Industries AG,
 1722 Health & Nutrition, Hanau, Germany). The amino acids levels of the diets were
 1723 determinate also by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) method – Evonik
 1724 (São Paulo, SP, Brazil) according to the methodology by Figueredo- Silva *et al.* (2015)
 1725 (Table 2).

1726 Diets preparation start including methionine in diets, powder methionine was
 1727 precoated with carboxymethyl cellulose (1.5 g CMC per 20 g amino acid) according to
 1728 Millamena *et al.* (1999) to improve the homogenization with other ingredients. The *A.*
 1729 *platensis* powder was acquired from Prilabsa® (RN, Brazil) has higher level of protein
 1730 than Brazilian fishmeal (Leal Santos, Rio Grande, RS, Brazil), 61.53 % and 56.82%
 1731 respectively. Powdered ingredients were homogenized in a V shaker Marconi model
 1732 MA200 and, after that, it was added fish oil and water. The final product was passed by
 1733 a meat grinder and then manually broken and sieved with different meshes (300 to 1500
 1734 µm) to obtain the final pellets which were dried at 60 °C for 24 h. Finished diets were
 1735 kept in plastic bags and stored at -18 °C until use. During the trial, pellet size was
 1736 adjusted with the shrimp growth according to Jory *et al.* (2001).

1737 Table 1. Ingredient composition (g/100 g) and proximate analysis (g/100 g dry weight,
 1738 n= 3) of experimental diets for *L. vannamei* containing different levels (%) of fishmeal
 1739 replacement with *A. platensis*.

Fishmeal replacement	0%	5%	10%	25%	50%	75%
Ingredients						
Fish meal ^a	42%	39.9%	37.8%	31.5%	21%	10.5%
<i>A. platensis</i> ^b	0%	2.1%	4.2%	10.5%	21%	31.5%

Soybean meal ^c	8.00%	7.95%	7.70%	7.00%	6.00%	5.00%
Brewer's yeast ^c	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%
Corn starch ^c	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%
Wheat meal	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%
Fish oil ^c	1,20%	1,50%	1,70%	2.60%	4.00%	5.40%
CMC ^d	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%
Mineral/vitamin premix ^e	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%
Cholesterol ^f	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%
Ca(H ₂ PO ₄) ^f	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%
Cellulose ^f	8.05%	7.80%	7.85%	7.65%	7.25%	6.85%
Methionine (DL) ^g	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
Proximate analyses (n= 9)						
Dry mater	93.58%	95.50%	95.82%	95.89%	95.84%	95.86%
Ash	13.29%	18.55%	16.56%	14.90%	12.11%	8.96%
Protein	33.04%	33.88%	31.86%	32.09%	33.29%	34.20%
Crude Fiber	9.17%	9.24%	9.15%	8.90%	8.63%	8.37%
Lipids	6.21%	6.00%	6.04%	6.31%	7.62%	8.33%
NFE ^h	27.74%	29.89%	27.95%	26.67%	28.98%	28.77%
Gross energy (cal/g) ^j	3984.96	3983.31	3963.33	3932.47	3879.98	3827.49

1740 ^a Leal Santos, Rio Grande, RS, Brazil.

1741 ^b Prilabsa® (RN, Brazil).

1742 ^c Campestre, São Paulo, Brazil.

1743 ^d CMC (Carboxymethylcellulose), Vetec, Rio de Janeiro, Brazil.

1744 ^e Premix M. Cassab, São Paulo, Brazil (vitamin A (500,000 UI/kg), vitamin D3 (250,000

1745 UI/kg), vitamin E (5000 mg/kg), vitamin K3 (500 mg/kg), vitamin B1 (1000 mg/kg), vitamin

1746 B2 (1000 mg/kg), vitamin B6 (1000 mg/kg), vitamin B12 (2000 mcg/kg), niacin (2500

1747 mg/kg), calcium pantothenate (4000 mg/kg), folic acid (500 mg/kg), biotin (10 mg/kg),

1748 vitamin C (10,000 mg/kg), choline (100,000 mg/kg), and inositol (1000 mg/kg). Trace

1749 elements: selenium (30 mg/kg), iron (5000 mg/kg), copper (1000 mg/kg), manganese (5000

1750 mg/kg), zinc (9000 mg/kg), cobalt (50 mg/kg), and iodine (200 mg/kg)).

1751 ^f VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brazil.

1752 ^g MetAmino®DL-methionine, feed grade 99%, Evonik Industries AG, Health & Nutrition,

1753 Hanau, Germany

1754 ^h Nitrogen- Free Extract (NFE). Calculated value (Merrill and Watt, 1973). NFE = 100 –
 1755 (crude protein + lipids + ash + moisture).

1756 ^j Energy was calculated as 16.7, 16.7 and 37.7 kJ/g of protein, carbohydrate and lipids,
 1757 respectively (calculated from physiological fuel values)

1758 Table 2. Amino acid profile (% of the diet) of experimental diets.

	0%	5%	10%	25%	50%	75%	Recommended values for shrimp (% of the diet)
Nonessential amino acid							
Aspartic acid	2.414	2.676	2.495	2.414	2.701	2.692	
Glutamic acid	3.728	4.117	3.878	3.728	4.100	4.129	
Cysteine	0.245	0.279	0.270	0.254	0.274	0.264	
Glycine	2.648	2.874	2.626	2.263	2.111	1.775	
Proline	1.710	1.881	1.700	1.547	1.482	1.260	
Serine	1.216	1.315	1.253	1.217	1.367	1.092	
Essential amino acid							
Arginine	1.880	2.077	1.936	1.842	1.992	2.019	2.32 ^a
Isoleucine	1.087	1.125	1.062	1.070	1.296	1.416	1.01 ^b
Leucine	1.917	1.976	1.867	1.871	2.191	2.333	1.70 ^b
Lysine	1.747	1.741	1.594	1.480	1.522	1.383	1.64 ^c
Phenylalanine	1.146	1.233	1.145	1.140	1.292	1.327	1.40 ^b
Threonine	1.130	1.204	1.138	1.114	1.264	1.614	1.51 ^d
Histidine	0.618	0.623	0.570	0.524	0.545	0.518	0.80 ^b
Valine	1.332	1.395	1.303	1.288	1.514	1.617	1.59 ^e
Methionine	0.954	0.987	0.913	0.876	0.917	0.895	0.67 ^f

1759 Tryptophan was not determined.

1760 ^a Zhou et al. (2012).

1761 ^b Millamena et al. (1999).

1762 ^c Xie et al. (2012).

1763 ^d Zhou et al. (2013).

1764 ^e Liu et al. (2014).

1765 ^f Lin et al. (2015).

1766 2.3. Evaluation of growth parameters

1767 At the end of the trial, the animals from each tank were counted and weighed
1768 individually to estimate the growth parameters and survival:

1769 Weight gain = (final wet weight – initial wet weight);

1770 Weekly weight gain = [(final wet weight – initial wet weight) / weeks];

1771 Feed conversion ratio = (dry feed intake / wet weight gain);

1772 Specific growth rate = (100% × [ln final weight – ln initial weight] / trial duration);

1773 Protein efficiency ratio = (wet weight gain / dry protein intake);

1774 Survival= (final number of shrimp/initial number of shrimp) × 100.

1775 2.4 Color

1776 After 28 days, six shrimps were collected from each experimental unit to perform the
1777 color analysis. The pigmentation was assessed in boiled shrimps (2 min in 2.0 L at 100° C)
1778 (Wade *et al.*, 2014). Pigmentation in cooked shrimps was measured using a calibrated Minolta
1779 Chromo Meter CR 300 (Osaka, Japan) colorimeter. Reflectance values of the different
1780 parameters read at the Minolta Chromo Meter are expressed as of lightness (L), redness (a)
1781 and yellowness (b), the Hue (H) and chroma (C) values were also calculated. Hue, namely the
1782 observable color (e.g. red, blue, yellow), is an angular measurement where 0° indicates a red
1783 hue, 90° denotes a yellow hue, 180° green and 270° blue one, and is calculated by the
1784 equation, $H = \arctan(b/a)$ (Hunt, 1977). Chroma is an expression of saturation or intensity of
1785 the color attained and is expressed by the equation, $C = (a^2 + b^2)^{1/2}$ (Hunt, 1977). For the color
1786 test they were selected six boiled shrimps per experimental unit and measured on five points
1787 along the body shrimp, three in the abdominal left side along the body shrimp two dorsal
1788 lectures (closest to head; mid-section; close to tail) and in two dorsal sections (close the head
1789 and tail)

1790 2.5 Total carotenoid content

1791 The total carotenoids contents (TCC) included in the experimental diets and shrimp
1792 muscle was estimated at the end of the experiment following the methodology described by
1793 Yanar *et al.* (2004). Six shrimp muscle samples and pellets diets, around 0.5 and 0.1 g,
1794 respectively, were homogenized with equal amounts of anhydrous sodium sulfate and with 10
1795 ml of acetone with pestle and mortar in the dark; homogenates were spilled in an amber glass
1796 jar of 50 ml with a lip. Samples were preserved for three days in a dark and room temperature
1797 (20° C), after that the samples were centrifuged for five min at 5000 x g. The supernatants

1798 were collected and read by the spectrophotometer (Biospectro, SP-22, Brazil) at 480 nm. To
1799 calculate TCC present in samples it was applied the formula: $TCC (\mu\text{g g}^{-1}) = \text{Abs} \times K \times V / e$
1800 $\times M$

1801 Where Abs is the absorbance value at λ 480 nm; K is constant (104); V is the volume
1802 of the extracting solution (ml); e is the extinction coefficient (1900) and M is the sample mass
1803 (mg).

1804 2.6 Apoptosis

1805 At the end of the trial, five shrimps were collected from each experimental unit. The
1806 hemolymph (approximately 30 μL) was extracted from 5 shrimps per tank from the ventral
1807 sinus using a 50 μL -Hamilton syringe. Shrimp hemolymph (5 μL) was spread onto a clean
1808 glass slide and air-dried, with 6 clean slides per treatment. The hemocytes in apoptosis were
1809 evaluated by the TUNEL method using the ApopTag® Plus Peroxidase in Situ Apoptosis
1810 Detection kit (Millipore) according to Charriaut-Marlangue and Ben-Ari (1995) and Wang
1811 and Zhang (2008).

1812 2.7 Biochemical measurements

1813 At the end of the trial, six shrimps per treatment were immersed in liquid nitrogen and
1814 then kept in ultrafreezer at -80°C until the biochemical determinations. Shrimps were
1815 dissected to remove the hepatopancreas and muscle. Samples were then homogenized (1:5,
1816 w/v) with buffer composed of Tris-Base (20 mM), EDTA (1.0 mM), sucrose (500 mM), KCl
1817 (150 mM) and dissolved in Milli Q water, with pH adjusted to 7.2. Homogenates were
1818 centrifuged ($9000 \times g$, 30 min at 4°C) and the supernatants kept and divided into two aliquots
1819 for later analysis of non-protein thiol groups (Sedlak and Lindsay, 1968) and levels of lipid
1820 peroxidation (TBARS assay) (Oakes and Van der Kraak, 2003). Total protein content in
1821 homogenates was determined using a commercial kit (Doles Reagents Ltda., Goiania, GO,
1822 Brazil), based on the Biuret method. Determinations were done in triplicate at 550 nm and
1823 used to calculate the non-protein thiol groups and TBARS data on a total proteins basis.

1824 *Lipid peroxidation*

1825 Lipid peroxidation was determined by TBARS (thiobarbituric acid reactive
1826 substances) assay following Oakes and Van der Kraak (2003) using 1,1,3,3-
1827 tetramethoxypropano (TMP, Across Organics) as standard. Aliquots 42 μl of homogenates

1828 reacted with thiobarbituric acid (0.8%, Sigma), and the fluorescence read using a white 96-
1829 well microplate with excitation length of 520 nm and emission of 580 nm (Victor 2, Perkin
1830 Elmer). Results are expressed in nanomoles of malondialdehyde MDA per gram of tissue
1831 (wet weight).

1832 *Non-protein thiols group (NPSH)*

1833 The samples were deproteinized with TCA 50% for determination of non-protein thiol
1834 groups (NPSH) using 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma) according to by
1835 Sedlak and Lindsay (1968). The samples were read in well-96 transparent microplate at
1836 wavelength of 405 nm, using an espectrofluorimeter (Bioteck. Synergy HT).

1837 2.8 Statistical analyses

1838 Data are shown as mean \pm 1 standard deviation. One-way analyses of variance
1839 (ANOVA) were applied after testing normality and variance homogeneity using Shapiro-
1840 Wilks and Levene, respectively. After assumptions verification, Newman-Keuls test with a
1841 5% significance level was applied to compare mean treatments (Sokal and Rohlf, 1995). If at
1842 least one assumption was not verified, a mathematical transformation was applied to data. In
1843 addition, to evaluate the relationship between MDA concentrations in shrimp muscle and its
1844 growth, a linear correlation was calculated.

1845 3. Results

1846 3.1. Water parameters

1847 No significant differences were observed in water quality parameters ($p > 0.05$). The
1848 water temperature was maintained in $29.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$, salinity in 32 ppt, the dissolved oxygen
1849 concentration was $6.50 \pm 0.75 \text{ mg L}^{-1}$, pH was 8.08 ± 1.90 . Total nitrogen concentration was
1850 maintained at $0.44 \pm 0.25 \text{ mg L}^{-1}$ and registered levels of nitrite and nitrate were 0.015 ± 0.010
1851 mg L^{-1} and $0.025 \pm 0.030 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. Alkalinity was maintained above 100 mg
1852 CaCO_3 of L^{-1} and this level just was corrected one time during the study by the lime
1853 application of 0.05 g L^{-1} to achieve pH and alkalinity levels recommended to *L. vannamei*
1854 growth according to Furtado et al. (2011).

1855 3.2. Performance results

1856 Significant differences ($p < 0.05$) were observed among the treatments for the following
 1857 variables: final weight, weight gain, survival, factor conversion ratio, protein efficiency ratio
 1858 and specific growth rate. Better results were obtained for shrimps that have been feeding with
 1859 diets that included high levels of microalgae meal (Table 2).

1860 Table 3. Initial weight (IW), Final weight (FW), weight gain (WG), weekly weight gain
 1861 (WWG), survival (%), factor conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER) and
 1862 specific growth rate (SGR). Results are expressed in mean and standard deviation ($n=5$).

	0%	5%	10%	25%	50%	75%
IW (g)	2.9 ± 0.49	3.0 ± 0.32	2.8 ± 0.45	2.6 ± 0.42	2.7 ± 0.22	2.6 ± 0.35
FW (g)	7.22 ± 0.18 c	6.89 ± 0.18 c	7.11 ± 0.29 c	7.88 ± 0.28 b	8.34 ± 0.26 a	8.03 ± 0.18 ab
WG (g)	4.79 ± 0.14 bc	4.48 ± 0.47 c	4.52 ± 0.25 c	5.15 ± 0.08 b	5.70 ± 0.01 a	5.60 ± 0.07 a
WWG (g)	0.96 ± 0.02 bc	0.89 ± 0.07 c	0.90 ± 0.03 bc	1.03 ± 0.01 ab	1.14 ± 0.002 a	1.12 ± 0.01 a
Survival (%)	92.86 ± 0.01 b	96.03 ± 2.24 ab	97.62 ± 2.38 ab	98.41 ± 1.37 a	100 ± 0.00 a	95.24 ± 2.38 ab
FCR	2.47 ± 0.05 b	2.59 ± 0.18 b	2.49 ± 0.09 b	2.16 ± 0.03 a	1.98 ± 0.06 a	2.07 ± 0.03 a
PER	0.40 ± 0.01 c	0.38 ± 0.02 c	0.40 ± 0.01 c	0.46 ± 0.01 b	0.50 ± 0.01 a	0.48 ± 0.01 ab
SGR	3.03 ± 0.20 a	2.92 ± 0.40 a	2.80 ± 0.06 a	2.94 ± 0.11 a	3.20 ± 0.17 a	3.32 ± 0.05 a

1863 Different letters within lines indicate significant differences ($p < 0.05$).

1864 3.3 Color results

1865 The muscle color results are shown in Table 3. All colors parameters were
 1866 significantly higher in shrimp tissue feeding with high levels of *A. platensis* when compared
 1867 with those that received the control diet. Significant differences ($p < 0.05$) in lightness, redness
 1868 and yellowness were detected between treatments where the results point out an increment of
 1869 an orange hue to shrimps fed with high levels of *A. platensis* diets (25%, 50%, and 75%).
 1870 However, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in L and b parameters among the
 1871 treatment 5% and the control.

1872 In relation to the total carotenoid content (TCC) in shrimp's muscle and fed with
 1873 different concentration of *A. platensis* results showed significant differences ($p < 0.05$) (Table
 1874 3). The high values of TCC in diets 25%, 50% and 75% allowed that the higher deposition
 1875 levels of TCC in shrimps' muscle were found in those treatments.

1876 Table 4. Lightness (L), redness (a), yellowness (b), chroma (C) and hue (H) in cooked
 1877 shrimps ($n=5$). Total carotenoids content in experimental diets (TCC diets; $n=6$) with different
 1878 levels of *A. platensis*. Total carotenoids content in shrimp muscle (TCC muscle; $n=6$) feeding

1879 with experimental diets. TCC data are expressed in $\mu\text{g/g}$. Results are expressed as mean \pm
 1880 standard deviation.

	0%	5%	10%	25%	50%	75%
L	61.81 \pm 7.95 a	63.05 \pm 9.52 a	57.26 \pm 9.02 b	56.37 \pm 9.15 bc	54.44 \pm 9.16 c	54.60 \pm 8.30 c
a	14.49 \pm 3.31 b	10.32 \pm 2.42 c	15.44 \pm 3.57 b	21.14 \pm 3.86 a	21.83 \pm 2.99 a	20.52 \pm 3.98 a
b	22.86 \pm 1.12 c	22.75 \pm 3.74 c	23.87 \pm 3.29 bc	25.95 \pm 4.53 ab	25.72 \pm 4.00 ab	26.62 \pm 2.13 a
C	26.90 \pm 0.70 bc	24.72 \pm 0.53 b	28.12 \pm 0.95 b	33.46 \pm 1.02 a	33.86 \pm 0.61 a	33.92 \pm 0.43 a
H	58.74 \pm 1.52 b	67.13 \pm 0.85 a	58.58 \pm 1.32 b	50.85 \pm 0.45 c	49.48 \pm 0.63 c	51.88 \pm 1.06 c
TCC (diets)	0.065 \pm 0.005c	0.183 \pm 0.01c	0.29 \pm 0.002c	1.23 \pm 0.272 b	1.68 \pm 0.001 ab	2.32 \pm 0.122 a
TCC(muscle)	0.041 \pm 0.01d	0.044 \pm 0.01dc	0.061 \pm 0.02bc	0.078 \pm 0.01 b	0.127 \pm 0.02a	0.113 \pm 0.02 a

1881 Different letters within lines indicate significant differences ($p < 0.05$).

1882 3.4 Hemocytes apoptosis

1883 The level of hemocytes apoptosis in the hemolymph samples results display
 1884 significant differences ($p < 0.05$) among the treatment without replacement of fish meal and the
 1885 treatments with fish meal replacement by *A. platensis*. The results are decreased trend of
 1886 apoptosis level in hemolymph when included *A. platensis* in shrimp diets and are shown in
 1887 Table 4.

1888 Table 5: Hemocytes apoptosis (%) in shrimp hemolymph. Results are expressed as mean \pm
 1889 standard deviation ($n=5$).

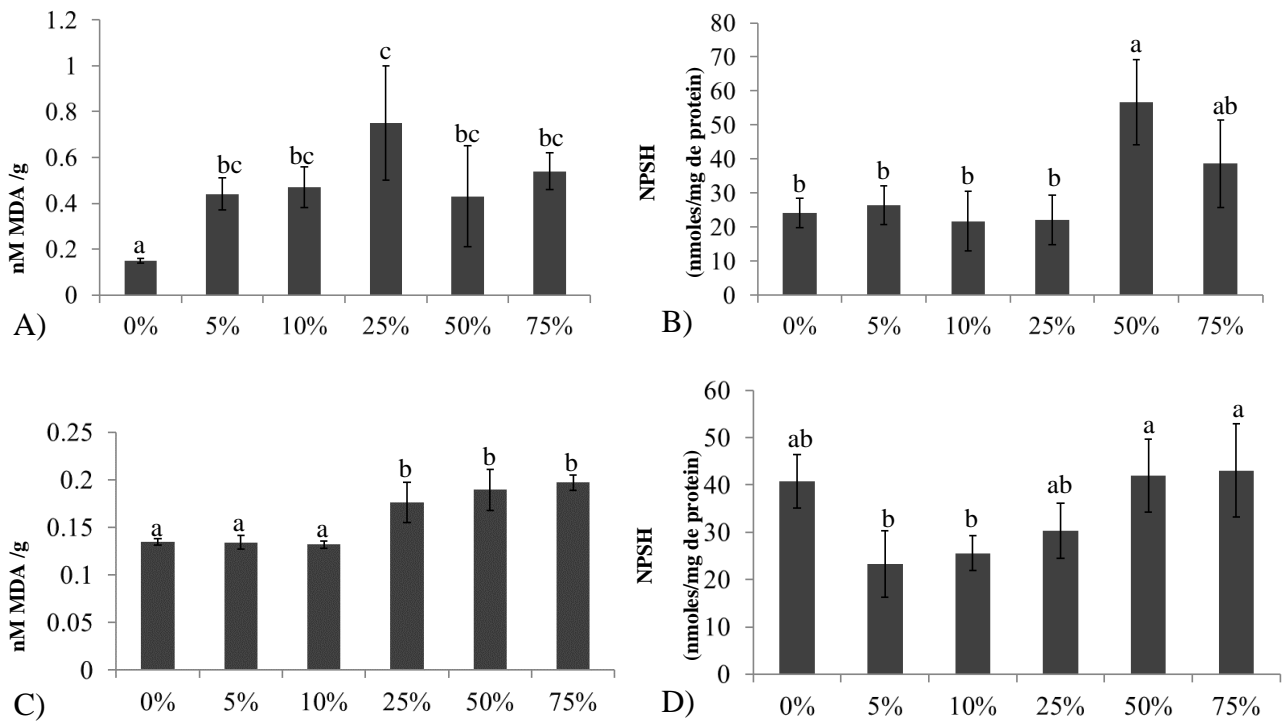
	0%	5%	10%	25%	50%	75%
Apoptosis (%)	0.81 \pm 0.10a	0.50 \pm 0.11b	0.19 \pm 0.08b	0.19 \pm 0.09b	0.23 \pm 0.08b	0.28 \pm 0.05b

1890 Different letters within lines indicate significant differences ($p < 0.05$).

1891 3.5 Biochemical measurements

1892 Malondialdehyde levels (MDA) in hepatopancreas were significant different ($p < 0.05$)
 1893 for shrimps fed *A. platensis* diets than the control treatment, resulting in an increase in the
 1894 lipid peroxidation (Figure 1, A-C). NPSH levels in shrimp hepatopancreas fed with 50%
 1895 ($p < 0.05$) *A. platensis* diets were high and denoted significant differences among treatments
 1896 with minor or no substitution of fishmeal for *A. platensis* meal (Figure 1, B-D). MDA levels
 1897 in shrimp muscle fed with diets rich in microalgae were higher than the treatment without and
 1898 poor contents of microalgae. NPSH values to the treatments fed with diets 5% and 10% were
 1899 lower than 0%, 25%, 50% and 75%. A significant positive linear correlation expressed by the

1900 regression equation $y = 18.327x + 4.6364$; $R^2 = 0.91$ ($p < 0.05$) between MDA concentration in
 1901 shrimp muscle and the final growth was observed.



1902 Figure 1. Malondialdehyde concentration ([MDA]/g tissue) in shrimp hepatopancreas feed
 1903 with different levels of *A. platensis* diets -A); Non protein thiol groups (NPSH) (nmoles/mg
 1904 de protein) in shrimp hepatopancreas feed with different levels of *A. platensis* diets -B);
 1905 Malondialdehyde concentration ([MDA]/g tissue) in shrimp muscle with different levels of *A.*
 1906 *platensis* diets; -C); Non protein thiol groups (NPSH) (nmoles/mg de protein) in shrimp
 1907 muscle feed with different levels of *A. platensis* diets -D).

1908 4. Discussion

1909 The improvement of aquaculture will allow maintaining this practice as the main
 1910 source of fish proteins. One of the ways to improve this technology will be the use of new
 1911 sources of protein other than fishmeal to produce feed, taking microalgae as an alternative for
 1912 that purpose. Different microalgae had been used in experimental diets to feed diverse
 1913 crustacean species successfully. Several authors place the *A. platensis* as an important food to
 1914 be introduced into the aquatic animal feed (Habib et al., 2008; Henrikson 1989).

1915 The growth results obtained in this study indicate the viability to replace 75% of fish
 1916 meal by *A. platensis* meal in shrimp feed, these results are according with Macias-Sancho et al
 1917 (2014) and reached higher values than Pakravan et al (2017). The absence of plant cell wall
 1918 provides high digestibility of cyanobacteria (Sasson 1997; Temouri et al., 2013), but also the

1919 nutritive profile allows omnivorous animals to take full advantage of this alternative
1920 ingredient in diets. The partial substitution level 75% reached in this trial to juvenile *L.*
1921 *vannamei* was higher than the results obtained to *Litopenaeus schmitti* larvae (Jaime-
1922 Ceballos et al., 2005) and to *Penaeus monodon* (Sivakumar et al., 2018), probably due to the
1923 omnivorous behavior of *L. vannamei*.

1924 In relation to color parameters, Temouri et al. (2013) endorse the colorful characters to
1925 a conjugated carbon-carbon double bond system that shapes the carotenoids. The strong
1926 pigmentation has a higher level of preference among the consumers because denotes freshness
1927 and higher quality product (Parisenti et al., 2011; Boonyaratpalin et al., 2001). The use of
1928 phytoplankton supplement increases the redness (a^*) value, giving a red intense color to
1929 shrimp (Parisenti et al., 2011). These results are according to Abreu et al. (2010), which
1930 attributed the increase in a^* value when a carotenoid source is supplemented in shrimp diets.
1931 In the present study, it was observed that shrimps gradually increase redness when increasing
1932 the levels of *A. platensis* levels in shrimp diets, same effects that were observed before in
1933 *Penaeus monodon* (Lorenz et al., 1998).

1934 The microalgae *A. platensis* is an important nutrient in aquaculture because it has a
1935 high level of digestible protein and contains natural pigments important for several
1936 physiological processes in crustaceans (Goiris et al., 2012; Kohal et al., 2017; Wade et al.,
1937 2017). Total carotenoids present in this microalga varied between 200 mg *100 g⁻¹ to 504 mg
1938 *100 g⁻¹, according to Belay et al. (2008) and Henrikson (1989), respectively. Ju et al. (2011)
1939 stated that shrimps can metabolize pigments as lutein, zeaxanthin, and β -carotene to
1940 Astaxantine and, consequently, increase the total levels of carotenoids in the muscle (Velasco
1941 et al., 1999; Ju et al., 2009). Parisenti et al. (2011a) implement shrimp diets with different
1942 microalgae and the carotenoid contents of *L. vannamei* increased. Results obtained at the end
1943 of this trial showed that total carotenoids in diets and in shrimp muscle increased with the
1944 replacement of fish meal by *A. platensis*, according to Li et al. (2015).

1945 Moreover, the role of the carotenoids in the protection of unsaturated lipids in the
1946 oxidation process is attributed to the protective effect of vitamin A, which is a result of the
1947 carotenoids metabolism (Regunathan & Wesley 2005). The *A. platensis* have antioxidant
1948 properties as demonstrated *in vitro* by Wang et al. (2007), but also pro-oxidant activity has
1949 been described in rabbit meat after consumption of high amounts of phycocyanin (Dal Bosco
1950 et al., 2014).

1951 Some of the different bioactive compounds of *A. platensis* are efficient as antioxidants
1952 (Miranda *et al.*, 1998). According to Jain (1988) and Kamel *et al.* (2014), malondialdehyde
1953 (MDA) is the metabolite of phospholipids peroxidation most used to assess the oxidative
1954 damage. At the end of this trial, the peroxidation levels in hepatopancreas and muscle of the
1955 shrimps shown different behavior. In the hepatopancreas, the MDA concentration increased in
1956 treatments that included *A. platensis* resulted in higher levels of peroxidation, contrary to the
1957 results obtained by Temouri *et al.* (2016) in rainbow trout. However, in shrimp muscle, the
1958 MDA levels were higher for diets with 25%, 50%, and 75% inclusion of *A. platensis*,
1959 although no negative effects were observed shrimp growth probably by the increment of the
1960 metabolism.

1961 In addition, high levels of NPSH in hepatopancreas for 50% treatment showed the
1962 increasing of activity against ROS. Besides, the effects induced by *A. platensis*
1963 supplementation is regulated by the amount of antioxidant content (Dal Bosco *et al.* 2014),
1964 and the concentrations of *A. platensis* employed in the experimental diets. Diets without and
1965 with low *A. platensis* inclusion decreased the lipid peroxidation levels these levels began to
1966 increase for the groups fed with diets that contents 25% or more of *A. platensis* inclusion.

1967 According to Kalafati *et al.* (2010), the spirulina supplementation caused a decrease in
1968 MDA concentration and an increase of reducing glutathione (GSH). High levels of GSH
1969 prevent lipid peroxidation including when the MDA levels in shrimp hepatopancreas is high
1970 for shrimps of the 50% treatment. In addition, the NPSH is a non enzymatic antioxidant
1971 defense mechanism important to the aquatic organisms (Salbego *et al.*, 2014; 2015) and
1972 higher levels of NPSH play an important effect against the lipid peroxidation counteracting
1973 the higher levels of oxidative damage. According to Augusti, *et al.* (2009), the increase of
1974 antioxidant enzymes activities and NPSH levels might occur as a defense response against
1975 free radicals. The increase observed in non-protein thiol groups in shrimp hepatopancreas and
1976 muscle might be due to the antioxidant effects caused by *A. platensis* compounds.

1977 The apoptosis was described as an important process in immune response (Terahara &
1978 Takahashi, 2008) and this activity is according to the needs for the immunological response
1979 (Macias- Sancho *et al.*, 2014). The potential effects of phycocyanin included in *A. platensis*
1980 improve the apoptosis functionality (Shih *et al.*, 2003). The GSSG can play a role increasing
1981 the mitochondrial fusion, as a protective process against apoptosis cellular in stressful
1982 situations (Halliwell & Gutteridge, 2015). These studies are according to results obtained for

1983 this trial, where the inclusion of *A. platensis* in shrimp diets generate a protective behavior
1984 against futures pathogenic infections and stress oxidative fits.

1985 5. Conclusion

1986 The replacement of fish meal by microalgae *A. platensis* in shrimp diets occasioned
1987 better performance in *Litopenaeus vannamei* because of the microalgae present compound
1988 with high digestibility and positive effects against the catabolism of muscle protein despite the
1989 negative effects in the lipids peroxidation when high concentrations of microalgae are
1990 included.

1991 6. Acknowledgments

1992 This work was supported by the National Council for Scientific and Technological
1993 Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel
1994 (CAPES), and Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA). Wasielesky, W.J.,
1995 Poersch, L.H, J.M. Monserrat, L. A. Romano and M.B Tesser are research fellows of CNPq.

1996 7. References

1997 Abreu, V. K. G., Pereira, A. L. F., Vidal, T. F., Zapata, J. F. F., Sousa Neto, M. A. D.,
1998 Freitas, E. R. D. 2010. Fatty acids, cholesterol, oxidative rancidity, and color of irradiated
1999 shrimp. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(4), 969-973.

2000 Alam, M. S., Teshima, S. I., Koshio, S., Ishikawa, M., Uyan, O., Hernandez, L. H. H.,
2001 Michael, F. R. 2005. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein
2002 isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 248(1), 13-19.

2003 Amaya, E., Davis, D.A., Rouse, D.B. 2007. Alternative diets for the Pacific White
2004 shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 262, 419–425.

2005 Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin.
2006 CNEXO, Brest (379 pp.)

2007 Ambrosi MA, Reinehr CO, Bertolin TE, Costa JAV, Colla LM (2009) Propriedades de
2008 saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29, 109-117.

2009 Asghar, A., Lin, C. F., Gray, J. I., Buckley, D. J., Booren, A. M., Crackel, R. L.,
2010 Flegal, C. J. 1989. Influence of oxidised oil and antioxidant supplementation on membrane
2011 bound lipid stability in broiler meat. *British Poultry Science*, 30, 815–823.

2012 APHA (American Public Health Association) (1998) Standard methods for the
2013 examination of water and wastewater (20th ed.), Washington, DC.

2014 Augusti, P. R., Conterato, G. M. M., Somacal, S., Sobieski, R., Quatrin, A., Maurer,
2015 L., Rocha, M P., Denardin, I. T., Emanuelli, T. 2009. Astaxanthin reduces oxidative stress,
2016 but not aortic damage in atherosclerotic rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*
2017 *and Therapeutics*, 14, 314-322.

2018 Belay, A., Kato, T., Ota, Y., 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an
2019 animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8(4), 303-311.

2020 Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., Panserat, S.,
2021 Seiliez, I. 2014. Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle
2022 protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 112(4),
2023 493-503.

2024 Bendiksen, E.Å., Johnsen, C.A., Olsen, H.J., Jobling, M., 2011. Sustainable
2025 aquafeeds: progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed
2026 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 314, 132-139.

2027 Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the
2028 determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research*, 11, 87–96.

2029 Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., Schlipalius, L. E.
2030 2001. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation,
2031 growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 32(s1), 182-190.

2032 Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role
2033 in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29:263-271.

2034 Charriaut-Marlangue, C., Ben-Ari, Y., 1995. A cautionary note on the use of the
2035 TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 7, 61–64.

2036 Chi, S. Y., Tan, B. P., Lin, H. Z., Mai, K. S., Ai, Q. H., Wang, X. J., Zhang, W.B., Xu,
2037 W., Liufu, Z. G. 2011. Effects of supplementation of crystalline or coated methionine on
2038 growth performance and feed utilization of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus*
2039 *vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 17(2): 1-9.

2040 Dal Bosco, A., Gerencsér, Z., Szendrő, Z., Mugnai, C., Cullere, M., Kovács, M.,
2041 Ruggeri, S., Mattioli, S., Castellini, C., Dalle Zotte, A. (2014). Effect of dietary
2042 supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit
2043 meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. *Meat*
2044 *Science*, 96(1), 114-119.

2045 de Jesus Raposo, M. F., de Morais, A. M. M. B., de Morais, R. M. S. C. 2016.
2046 Emergent sources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine Drugs*, 14(2), 27;
2047 doi:[10.3390/md14020027](https://doi.org/10.3390/md14020027)

2048 Elmada, C. Z., Huang, W., Jin, M., Liang, X., Mai, K., Zhou, Q. 2016. The effect of
2049 dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease
2050 resistance of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Nutrition*, 22(6),
2051 1163-1173.

2052 Escudero Álvarez, E., González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición*
2053 *hospitalaria*, 21, 61-72.

2054 Espe, M., Veiseth-Kent, E., Zerrahn, J. E., Rønnestad, I., Aksnes, A. 2016. Juvenile
2055 Atlantic salmon decrease white trunk muscle IGF-1 expression and reduce muscle and plasma
2056 free sulphur amino acids when methionine availability is low while liver sulphur metabolites
2057 mostly is unaffected by treatment. *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 801-812.

2058 Estrada, J. P., Bescós, P. B., Del Fresno, A. V. 2001. Antioxidant activity of different
2059 fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il farmaco*, 56(5), 497-500.

2060 FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la
2061 seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

2062 Figueiredo-Silva, C., Lemme, A., Sangsue, D., Kiriratnikom, S. (2015). Effect of
2063 DL-methionine supplementation on the success of almost total replacement of fish meal with
2064 soybean meal in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis*
2065 *mossambicus*). *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 234-241.

2066 Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of*
2067 *Nutritional Biochemistry*, 1(5), 228-237.

2068 Furtado, P.S., Poersch, L.H.S., Wasielesky, W., 2011. Effect of calcium hydroxide,
2069 carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp
2070 *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 321, 130–
2071 135.

2072 Gershwin, M. E., Belay, A. (Eds.). (2007). *Spirulina in human nutrition and health*.
2073 CRC press.

2074 Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., Baart, E., De Paepe,
2075 D., Baart, E., Gino, J. De Cooman, L. 2014. Detection of flavonoids in microalgae from
2076 different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, 50(3), 483-492.

2077 Halliwell, B., Gutteridge, J. M. 2015. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford
2078 University Press, USA.

2079 Hernández, O. E. A., Hernández, L. H. H., Miyasaka, A. S., Lugo, M. G. 2017. Effects
2080 of diets with whole plant-origin proteins added with different ratios of taurine: methionine on
2081 the growth, macrophage activity and antioxidant capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus*
2082 *mykiss*) fingerlings. *Veterinary and Animal Science*, 3, 4-9.

2083 Henrikson, R. 1989. Earth food spirulina. *Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc*,
2084 187.

2085 Hunt, R. W. G. 1977. The specification of colour appearance. I. Concepts and
2086 terms. *Color Research & Application*, 2(2), 55-68.

2087 Huo, Y., Zeng, W., Jin, M., Li, M., Xie, F., Zhou, Q. 2014. Methionine requirement of
2088 juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chinese Journal of Animal*
2089 *Nutrition*, 12, 022

2090 Itziou, A., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2011. *In vivo* and *in vitro* effects of
2091 metals in reactive oxygen species production, protein carbonylation, and DNA damage in land
2092 snails *Eobania vermiculata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4),
2093 697-707.

2094 Jaime-Ceballos, B., Villareal, H., Garcia, T., Pérez-Jar, L., Alfonso, E., 2005. Effect of
2095 *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus*
2096 *schmitti* shrimp larvae. *Revista de Investigación Marina*. 26, 235–241.

2097 Jain, S. K. 1988. Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of
2098 human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 937, 205-210.

2099 James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., Vasudevan, J., 2006. Effect of dietary
2100 Spirulina level on growth, fertility coloration and leucocyte count in red swordtail,
2101 *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgeh* 58, 97–104.

2102 Jamil, A. R., Akanda, M. R., Rahman, M. M., Hossain, M. A., Islam, M. S. 2015.
2103 Prebiotic competence of spirulina on the production performance of broiler chickens. *Journal*
2104 *of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(3), 304-309.

2105 Jang IK, Pang Z, Yu J, Kim SK, Seo HC, Cho YR. 2011. Selectively enhanced
2106 expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in
2107 the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Immunology*, 12:70,

2108 Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L.,
2109 Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., 2001. A global review of shrimp feed

2110 management: status and perspectives. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), The NewWave,
2111 Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture. The World
2112 Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 104–152.

2113 Ju, Z. Y., Forster, I. P., Dominy, W. G. 2009. Effects of supplementing two species of
2114 marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival, and composition of
2115 shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 292(3), 237-243.

2116 Ju, Z. Y., Deng, D. F., Dominy, W. G., Forster, I. P. 2011. Pigmentation of Pacific
2117 white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by dietary astaxanthin extracted from *Haematococcus*
2118 *pluvialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(5), 633-644.

2119 Kalafati, M., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Paschalis, V., Theodorou, A. A.,
2120 Sakellariou, G. K., Koutedakis, Y., Kouretas, D. (2010). Ergogenic and antioxidant effects of
2121 *Spirulina* supplementation in humans. *Medicine and Science in Sports and Exercise*
2122 *Journal*, 42(1), 142-51

2123 Kamel, N., Burgeot, T., Banni, M., Chalghaf, M., Devin, S., Minier, C., Boussetta, H.,
2124 2014. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of
2125 hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon
2126 *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 6108-6123.

2127 Khanzadeh, M., Fereidouni, A. E., Berenjestanaki, S. S. 2016. Effects of partial
2128 replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival,
2129 body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus*
2130 *trichopterus*) (Pallas, 1770). *Aquaculture International*, 24(1), 69-84.

2131 Kohal, M. N., Fereidouni, A. E., Firouzbakhsh, F., Hayati, I. 2017. Effects of dietary
2132 incorporation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* meal on growth, survival, body
2133 composition, and reproductive performance of red cherry shrimp *Neocaridina davidi*
2134 (Crustacea, Atyidae) over successive spawnings. *Journal of Applied Phycology*, 1-13.

2135 Koru, E. 2012. Earth food spirulina (*Arthrospira*): production and quality standarts, in
2136 food additive, in *In Tech*, ed Y. El-Samragy, 191–202.

2137 Li, Y., Xiao, G., Mangott, A., Kent, M., Pirozzi, I. 2016. Nutrient efficacy of
2138 microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus*
2139 *monodon*. *Aquaculture Research*, 47(11), 3625-3635.

2140 Lin, H., Chen, Y., Niu, J., Zhou, C., Huang, Z., Du, Q., Zhang, J. 2015. Dietary
2141 methionine requirements of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, of three different
2142 sizes. . *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 67: 1–10.

2143 Liu, F. J., Liu, Y. J., Tian, L. X., Li, X. F., Zhang, Z. H., Yang, H. J., Du, Z. Y. 2014.
2144 Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus*
2145 *vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquaculture international*, 22(4), 1481-1497

2146 Ma, D., Hou, Y., Du, L., Li, N., Xuan, R., Wang, F., Jing, W., Wang, L., 2013.
2147 Oxidative damages and ultrastructural changes in the sperm of freshwater crab *Sinopotamon*
2148 *henanense* exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 244-249.

2149 Macari, V., Putin, V., Gudumac, V., Rudic, V., Macari, A., Pavlicenco, N. (2011). The
2150 Influence of the BioR remedy administration on the prooxidant (oxidant)-antioxidant system
2151 parameters in broilers. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary*
2152 *Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 68(1), 200-206.

2153 Martínez-Palma, N., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortiz, G. 2015. Determination of
2154 antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira*
2155 *maxima*) obtained by simulated gastrointestinal digestion. *Revista Mexicana de Ingeniería*
2156 *Química*, 14(1) 25-34

2157 Masuda, T., Otomo, R., Kuyama, H., Momoji, K., Tonomoto, M., Sakai, S.,
2158 Nishimura, O. Sugawara, T., Hirata, T. 2012. A novel type of prophenoloxidase from the
2159 kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in
2160 crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1), 61-68.

2161 Meyers, S. P. (2000). Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies
2162 acuáticas. *Avances en Nutrición Acuícola IV*, 473-491.

2163 Millamena, O. M., Bautista-Teruel, M. N., Kanazawa, A. 1996. Methionine
2164 requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon Fabricius*. *Aquaculture*, 143(3-4), 403-
2165 410.

2166 Oakes KD, Van der Kraak GJ. 2003. Utility of TBARS assay in detecting oxidative
2167 stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent.
2168 *Aquatic Toxicology*. 63:447-463.

2169 Ostermeyer, U., Molkentin, J., Lehmann, I., Rehbein, H., Walte, H. G. 2014.
2170 Suitability of instrumental analysis for the discrimination between wild-caught and
2171 conventionally and organically farmed shrimps. *European Food Research and*
2172 *Technology*, 239(6), 1015-1029.

2173 Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B. M., Mancini-Filho, J. 1998. Antioxidant
2174 activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological*
2175 *Research*, 31(8), 1075-1079.

2176 Paital, B., Chainy, G.B., 2014. Effects of temperature on complexes I and II-mediated
2177 respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the
2178 mud crab *Scylla serrata*. *Journal of Thermal Biology*, 41, 104-111.

2179 Parisenti, J., Beirão, L. H., Maraschin, M., Mourino, J. L., Do Nascimento Vieira, F.,
2180 Bedin, L. H., Rodrigues, E. 2011a. Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with
2181 *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin. *Aquaculture Nutrition*, 17(2).

2182 Parisenti, J., Beirão, L. H., Tramonte, V. L., Ourique, F., da Silveira Brito, C. C.,
2183 Moreira, C. C. 2011b. Preference ranking of colour in raw and cooked shrimps. *International*
2184 *Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2558-2561.

2185 Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M.M., Hajimoradloo, A., Noori, F. 2017.
2186 Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet
2187 of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid
2188 composition and responses to ammonia and hypoxia stress. *Aquaculture Research*, 48:5576–
2189 5586.

2190 Richard, L., Blanc, P. P., Rigolet, V., Kaushik, S. J., Geurden, I. 2010. Maintenance
2191 and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilization efficiencies
2192 in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *British journal*
2193 *of nutrition*, 103(7), 984-995.

2194 Riss, J., Décordé, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J. C., Jouy, N., Brune J.P., Oréal,
2195 H., Cristol, J.P., Rouanet, J. M. 2007. Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina*
2196 *platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase
2197 expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food*
2198 *Chemistry*, 55(19), 7962-7967.

2199 Regunathan, C., Wesley, S. G. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp
2200 broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*, 12(6), 425-432.

2201 Rolland, M., Skov, P. V., Larsen, B. K., Holm, J., Gómez-Requeni, P., Dalsgaard, J.
2202 2016. Increasing levels of dietary crystalline methionine affect plasma methionine profiles,
2203 ammonia excretion, and the expression of genes related to the hepatic intermediary
2204 metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and*
2205 *Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 198, 91-99.

2206 Salbego, J., Becker, A.G., Gonçalves, J.F., Menezes, C.C., Heldwein, C.G.,
2207 Spanevello, R.M., Loro, V.L., Schetinger, M.R.C., 2014. The essential oil from *Lippia alba*

2208 induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation.
 2209 *Neotropical Ichthyology*, 12, 811-818.

2210 Salbego, J., Becker, A.G., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Gonçalves, J.F., LORO,
 2211 V.L., Morsch, V.M.M., Schetinger, M.R.C., Maldaner, G., Morel, A.F. BALDISSEROTTO,
 2212 B., 2015. Methanolic extract of added to transport water alters biochemical parameters of the
 2213 silver catfish *Condalia buxifolia**Rhamdia quelen*. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands),
 2214 vol. 437, pp. 46-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.022>.

2215 Sasson, A. 1997. Foreword. In: Vonhask A (eds) *Spirulina platensis (Arthrospira)*:
 2216 physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis, London.

2217 Sayed, A. E. D. H., El-Sayed, Y. S., Ali, H. 2017. Hepatoprotective efficacy of
 2218 *Spirulina platensis* against lead-induced oxidative stress and genotoxicity in catfish *Clarias*
 2219 *gariepinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 143, 344-350.

2220 Scaria, J., Kumuthakalavalli, R., Xavier, R. L. 2000. Feed utilization and growth
 2221 response of selected ornamental fishes in relation to feeds formulated with *Spirulina*,
 2222 mushroom and water fern. *Environment and Ecology*, 18(1), 104-108.

2223 Sedlak, J., Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
 2224 sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.

2225 Shahidi, F., Brown, J. A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and
 2226 aquaculture. *Critical Reveiws in Food Science*, 38(1), 1-67.

2227 Shih, S. R., Tsai, K. N., Li, Y. S., Chueh, C. C., Chan, E. C. 2003. Inhibition of
 2228 enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga
 2229 *Spirulina platensis*. *Journal of medical virology*, 70(1), 119-125.

2230 Sivakumar, N., Sundararaman, M., & Selvakumar, G. (2018). Evaluation of growth
 2231 performance of *Penaeus monodon* (Fabricius) fed diet with partial replacement of fishmeal by
 2232 *Spirulina platensis* (Sp) meal. *Indian Journal of Animal Research*, 3438: 1-6. DOI:
 2233 [10.18805/ijar.B-3438](https://doi.org/10.18805/ijar.B-3438)

2234 Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., Seiliez, I. 2016. Dietary methionine
 2235 imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino
 2236 acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 454, 56-
 2237 65.

2238 Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in
 2239 Biological Research, 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York 0-7167-2411-1 (887 pp.).

2240 Temouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S., 2013. The effects of *Spirulina platensis*
2241 meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout
2242 (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396–399, 14–19.

2243 Teimouri, M., Yeganeh, S., Amirkolaie, A. K. 2016. The effects of *Spirulina platensis*
2244 meal on proximate composition, fatty acid profile and lipid peroxidation of rainbow trout
2245 (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Aquaculture Nutrition*, 22(3), 559-566.

2246 Terahara, K., Takahashi, K. G. 2008. Mechanisms and immunological roles of
2247 apoptosis in molluscs. *Current pharmaceutical design*, 14(2), 131-137.

2248 Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment
2249 of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicas* (Bate).
2250 *Aquaculture Research*, 33(6), 395-402.

2251 Trevisan, R., Mello, D. F., Uliano-Silva, M., Delapedra, G., Arl, M., Dafre, A. L.
2252 2014. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems
2253 in bivalves during peroxide exposure. *Marine environmental research*, 101, 81-90.

2254 UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
2255 Manual and Guides, 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.

2256 Velasco, M., Lawrence, A. L., Castille, F. L. 1999. Effect of variations in daily
2257 feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in
2258 zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*, 179(1), 141-148.

2259 Wade, N. M., Cheers, S., Bourne, N., Irvin, S., Blyth, D. and Glencross, B. D. 2017.
2260 Dietary astaxanthin levels affect colour, growth, carotenoid digestibility and the accumulation
2261 of specific carotenoid esters in the Giant Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*
2262 *Research*, 48(2), 395-406.

2263 Wang, X. Q., Li, L. N., Chang, W. R., Zhang, J. P., Gui, L. L., Guo, B. J., Liang, D. C.
2264 2001. Structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel
2265 monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. *Acta Crystallographica*
2266 *Section D: Biological Crystallography*, 57(6), 784-792.

2267 Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J., Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of *Spirulina*
2268 *platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 105, 36–41.

2269 Wang, W., Zhang, X., 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses
2270 in shrimp. *Fish Shellfish Immunology*. 25, 522–527.

2271 Wu G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D., (2004) Glutathione
2272 metabolism and its implications for health. *Journal Nutrition*.;134(3): 489–92.

2273 Xie, S. W., Tian, L. X., Jin, Y., Yang, H. J., Liang, G. Y., Liu, Y. J. (2014). Effect of
2274 glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of
2275 juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. *Aquaculture*, 418,
2276 159-164.

2277 Yanar, Y., Mehmet, Ç. and Yanar, M. (2004) Seasonal changes in total carotenoid
2278 contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*)
2279 inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chemistry* 88.2: 267-269.

2280 Yu, B., Wang, J., Suter, P. M., Russell, R. M., Grusak, M. A., Wang, Y., Wang, Z.,
2281 Yin, S., Tang, G. (2012). Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to
2282 humans. *British Journal of Nutrition*, 108(4), 611-619.

2283 Zhou, Q.C., Zeng, W.P., Wang, H.L., Wang, T., Wang, Y.L., Xie, F.J., 2012. Dietary
2284 arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*
2285 364–365, 252–258.

2286 Zhou, Q.C., Wang, Y.L., Wang, H.L., Tan, B.P., 2013. Dietary threonine requirements
2287 of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 392–395, 142–147.

2288

CAPÍTULO 4

2289 Efeitos da *Arthrospira platensis* na modulação das comunidades bacterianas no intestino de
2290 juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

2291 Artigo formatado para submissão em revista: Aquaculture international

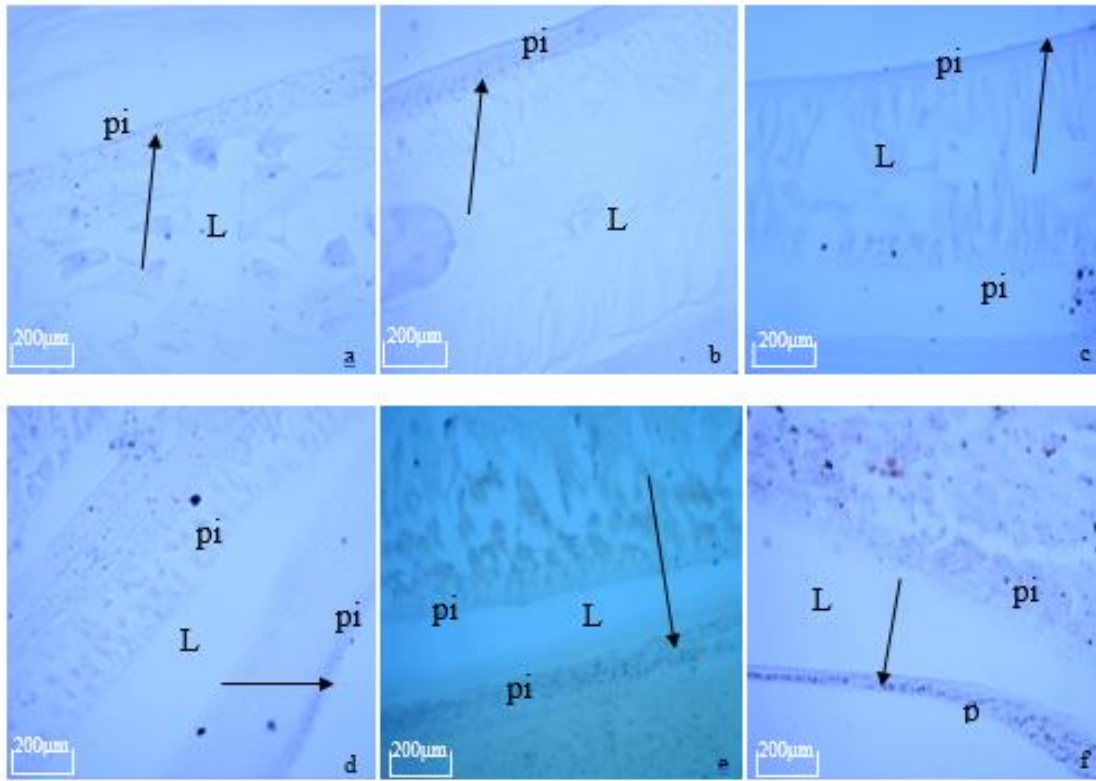
2292 **Observação:** foi incluído um resumo expandido em português

2293 **RESUMO EXPANDIDO**

2294 O aprimoramento das dietas balanceadas utilizadas na aquicultura é uma ferramenta
2295 importante para melhorar a produção de camarões. A procura por ingredientes alternativos
2296 com efeito benéfico na saúde dos organismos produzidos e alto valor nutricional é essencial
2297 para a formulação de novas rações. A microalga *Arthrospira platensis* apresenta as premissas
2298 para poder ser o ingrediente principal a utilizar na formulação de novas dietas para
2299 organismos aquícolas. A microalga *A. platensis* contém alto teor protéico (50-70%), perfil de
2300 aminoácidos essenciais adequados. Ademais já foi confirmada como efetivo prebiótico em
2301 diferentes organismos. O valor desse composto é de alta importância para a produção de
2302 animais aquícolas visto que o uso de substâncias naturais pode substituir o uso de antibióticos
2303 ou outros produtos que elevam o custo da produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o
2304 efeito prebiótico da microalga *Arthrospira platensis* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*.
2305 Seis dietas isoproteicas com diferentes níveis de substituição (0%, 5%, 10%, 25%, 50% e
2306 75%) de farinha de peixe por farinha de microalga *A. platensis* foram utilizadas durante 45
2307 dias. O estudo foi realizado em 18 tanques plásticos de 250 litros cada, onde se estocaram 120
2308 cam/ m². Os parâmetros de qualidade da água como concentração de oxigênio dissolvido,
2309 temperatura, pH, concentração de amônia, nitrito e nitrato foram avaliados ao longo do
2310 experimento e mantidos com renovações diárias de água de 33% da capacidade das unidades
2311 experimentais para mantê-los dentro dos níveis apropriados para o desenvolvimento da
2312 espécie. No final do período experimental, os resultados mostraram diferença na composição
2313 da parede intestinal entre os tratamentos com dietas de alto nível de farinha de microalga
2314 (25%, 50% e 75%) e os tratamentos controle e de baixo nível de substituição (0%, 5% e
2315 10%). As análises histológicas realizadas ao final do experimento coincidiram na maior
2316 ocorrência de bactérias com estrutura típica de bactéria Gram positiva no intestino dos
2317 camarões com os níveis de maior substituição de farinha de peixe por farinha de cianobactéria
2318 como se observa na figura 1, fato que pode ter causado a melhoria no desempenho e
2319 sobrevivência de *Litopenaeus vannamei*. Desta maneira, podemos evidenciar os efeitos
2320 positivos na regulação da microbiota realizados pela cianobactéria *A. platensis* no intestino do
2321 camarão branco devido às características dos compostos que formam a cianobactéria.

2322 *Palavras chave: bactéria, Gram negativa, microalga, prebiótico.*

Figura1. Análises histológicas com coloração de Gram em intestino camarão. Corte longitudinal do quarto e quinto somito do corpo do camarão. Imagens em ótico 40x.



Lâminas do intestino posterior de *Litopenaeus vannamei*. Tratamentos (a- 0%; b-5%; c-10%; d- 25%; e-50% e f-75%): a) baixa ocorrência de bactéria Gram positiva em camarões alimentados com rações de 0% *A. platensis*; b-f) aumento de bactéria Gram positiva na parede intestinal dos camarões alimentados com rações com *A. platensis*. Imagens em óptico de 40x. Lumen intestinal (L); parede intestinal (pi); setas sinalizam os casos positivos para a coloração de bactéria Gram positiva.

ANEXO 3

2323

2324 Effects of *Arthrospira platensis* in gut bacterial communities modulation in *Litopenaeus*

2325 *vannamei* juveniles

2326

2327 Joaquin Macias-Sancho ^{a,c}, Virginia Fonseca Pedrosa ^{a,b}, Luis Alberto Romano ^{a,b}, Wilson

2328 Wasielesky ^{a,c}, Marcelo Borges Tesser ^{a,d}, Luís Henrique Poersch ^{a,c}

2329

2330 Federal University of Rio Grande- FURG. Marine Aquaculture Station, Rua do hotel 2,

2331 Cassino, Rio Grande, RS. CEP: 96210-030

2332 Email address: joaquinmaciassancho@gmail.com

2333 Telephone: +55 53 32361685

2334 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5993-9827>

2335 a Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande -FURG,

2336 Rio Grande, RS, Brazil

2337 b Laboratório de Patologia e Imunologia de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia

2338 (IO), Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

2339 c Laboratório de Carcinocultura, Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio

2340 Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

2341 d Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia (IO),

2342 Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil

2343 ABSTRACT

2344 The use of improved balanced diets in shrimp aquaculture is an important tool to optimize
2345 production. Diets that include natural ingredients with known healthy proprieties are
2346 beneficial to the aquaculture food industry. The microalga *Arthrospira platensis* is a
2347 promising ingredient for new diets because of its nutritive profile and its effects on health.
2348 The aim of this study was to evaluate the effects of diets with different levels of the microalga
2349 *A. platensis* on the occurrence of gut bacteria in juvenile *Litopenaeus vannamei*. Six diets
2350 with different substitution levels (0%, 5%, 10%, 25%, 50% and 75%) of fish meal by *A.*
2351 *platensis* meal were evaluated over 45 days in a system composed of 18 250 L plastic tanks
2352 with stocking densities of 120 shrimp/m². At the end of the experimental period, histological
2353 analyses were performed to evaluate the effects of the microalgae on the shrimp gut and to
2354 identify the different bacterial groups present. The results showed significant differences in
2355 gut deposition due to the diets with high levels of microalgae meal (25%, 50%, and 75%)
2356 compared to the control and low-microalgae diets (0%, 5%, and 10%). Specifically, the
2357 shrimp fed with higher substitution levels of *A. platensis* demonstrated more deposition of
2358 Gram-positive bacteria along the intestine wall than shrimp that were fed no or low levels of
2359 *A. platensis*. This deposition may increase the surface area available to absorb nutrients and
2360 thus lead to better shrimp performance. These observations demonstrate that experimental
2361 diets with varying levels of the microalga *A. platensis* can affect the deposition of different
2362 types of bacteria in the shrimp gut, and they validate the prebiotic value of this microalga for
2363 the Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

2364 *Keywords: Gram-positive; intestine; prebiotic; shrimp; structural.*

2365 1. Introduction

2366 Fishmeal is the main feed ingredient used in aquaculture because of its nutritional value,
2367 including high levels of protein, and its high digestibility (Tacon and Metian 2015, Camacho-
2368 Rodríguez et al. 2017). However, high pressure on natural fish stocks has led to an increase in
2369 the price of this commodity; therefore, the use of alternative ingredients with stable
2370 production and high nutritive value must increase to reduce the costs of aquaculture (FAO
2371 2016). The future of the feed production industry for aquaculture relies upon the discovery or

2372 development of new, highly digestible, protein-rich ingredients that also contain bioactive
2373 compounds with health-promoting capacities.

2374 Natural products such as medicinal plants, marine algae, and their extracts are important
2375 because of their ability to restrain diseases in aquaculture (Thanigaivel et al. 2016).
2376 Microalgae have been used to formulate aquaculture feed due to their capacity to improve the
2377 growth and immune systems of aquatic organisms (Gamboa-Delgado et al. 2016). Among
2378 them, *Arthrospira platensis* stands out as a promising product to be used in aquaculture
2379 (Belay et al. 1996; Pulz and Gross 2004; Palmegiano et al. 2005, Gershwin and Belay 2008).
2380 Some studies have shown that the inclusion of *A. platensis* in the diets of aquatic organisms
2381 improves the organisms' immune status and growth performance (Macias-Sancho et al. 2014,
2382 Adel et al. 2016).

2383 In addition to possessing nutritional qualities, *A. platensis* is also effective against diverse
2384 viruses (Radonic et al. 2010) and pathogenic bacteria (Hoseini et al. 2013). Studies have
2385 confirmed that *A. platensis* stimulates the growth of beneficial bacteria both *in vitro*
2386 (Bhowmik et al. 2009) and, as recently demonstrated, in the digestive system of mice
2387 (Neyrinck et al. 2017). Raposo et al. (2013) also reported that this species of microalga
2388 promotes the occurrence of *Lactobacillus* sp. in the human gut.

2389 Hence, the objective of the present study was to evaluate the effects of diets containing
2390 different replacement levels of fishmeal by *A. platensis* meal on the intestinal structures and
2391 gut bacterial communities in shrimp.

2392 2. Materials and methods

2393 2.1. Shrimp source and experimental design

2394 Nauplii of *L. vannamei* were purchased from Aquatec, RN, Brazil, and transported to the
2395 Marine Aquaculture Station of Federal University of Rio Grande (FURG), RS, Brazil. They
2396 were maintained in 10,000 L tanks at 27 °C and 34 ppt of salinity and were fed commercial
2397 food until they reached the juvenile stage, at which point the experiment was begun.

2398 The experiment lasted 49 days and was conducted in 18 plastic tanks with volumes of 250 L.
2399 Juvenile shrimp with mean masses of 0.61 ± 0.02 g (\pm SD) were stocked at a density of 88
2400 shrimp/m². The tanks were siphoned daily to remove fecal material, uneaten food and other

2401 organic matter and thus to maintain the water quality. The water exchange rate was 33% of
2402 the total tank volume per day. Reserve water was maintained at 28 °C in 8,000 L tanks and
2403 was treated with 20 mg chlorine/L to kill pathogens and nonpathogenic bacteria as described
2404 by Boyd and Tucker (1998). Six diets were formulated with different levels of *A. platensis*
2405 (0%, 5%, 10%, 25%, 50% and 75%). Each treatment was replicated three times, and
2406 treatments were distributed randomly among the tanks. The tanks were fed three times per day
2407 at 8:00, 14:00 and 18:00 as per Jory et al. (2001).

2408 The dissolved oxygen and temperature were measured on a daily basis using a digital
2409 oximeter (YSI 55, Yellow Springs, OH, USA). The pH was also measured daily using a
2410 digital pH meter (pH 100 Ecosense YSI, Yellow Springs, OH, USA). The salinity was
2411 measured once a week with an optical refractometer (RTS-101, Atago U.S., Bellevue, WA,
2412 USA). Water samples were taken three times per week to measure the total concentrations of
2413 ammonia (UNESCO 1983), nitrite (Bendschneider and Robinson 1952), nitrate (Aminot and
2414 Chaussepied 1983) and alkalinity (APHA 1998). A photoperiod of 12: 12 (light: dark) was
2415 maintained throughout the experimental period.

2416 2.2 Diet preparation

2417 Six diets were formulated to contain 33% protein and 7.0% lipids. The diets differed from
2418 each other regarding the level of fishmeal replacement by *A. platensis* (5%, 10%, 25%, 50%
2419 and 75%). *A. platensis* was bought from Prilabsa® (RN, Brazil). The optimal methionine
2420 levels indicated by Hou et al. (2014) were achieved in all test diets through methionine
2421 supplementation (MetAmino®DL-methionine, feed grade 99%, Evonik Industries AG, Health
2422 & Nutrition, Hanau, Germany). The methionine was pre-coated with carboxymethyl cellulose
2423 (1.5 g CMC per 20 g amino acid) as described by Millamena et al. (1999). Before the diets
2424 were prepared, the ingredients were ground to obtain a particle size of 100 µm. The
2425 preweighed ingredients were then mixed and pelleted using a meat grinder. The pellets were
2426 dried at 60 °C for 24 h. Finished diets were stored in plastic bags at -18 °C until use.

2427 The proximate compositions of the diets are presented in Table 1 and were determined
2428 according to the methodology of the Association of the Official Analytical Chemists (Horwitz
2429 and Latimer 2000). The total amino acid contents of the principal diet ingredients were

2430 determined using Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) by Evonik (São Paulo, SP,
2431 Brazil) according to the methods of Figueiredo-Silva et al. (2015).

2432 Table 1. Ingredient composition (g/100 g) and proximate analysis (g/100 g dry weight, n= 3)
2433 of experimental diets for *Litopenaeus vannamei* containing different levels of fishmeal
2434 replacement.

Fishmeal replacement	0%	5%	10%	25%	50%	75%
Ingredients						
Fish meal ^a	42%	39.9%	37.8%	31.5%	21%	10.5%
<i>A. platensis</i> ^b	0%	2.1%	4.2%	10.5%	21%	31.5%
Soybean meal ^c	8.00%	7.95%	7.70%	7.00%	6.00%	5.00%
Brewer's yeast ^c	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%
Corn starch ^c	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%	18.00%
Wheat meal	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%	12.00%
Fish oil ^c	1.20%	1.50%	1.70%	2.60%	4.00%	5.40%
CMC ^d	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%
Mineral/vitamin premix ^e	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%
Cholesterol ^f	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%	0.50%
Ca(H ₂ PO ₄) ^f	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%	2.00%
Cellulose ^f	8.05%	7.80%	7.85%	7.65%	7.25%	6.85%
Methionine (DL) ^g	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
Proximate analyses						
Dry matter	93.58%	95.50%	95.82%	95.89%	95.84%	95.86%
Ash	13.29%	18.55%	16.56%	14.90%	12.11%	8.96%
Protein	33.04%	33.88%	31.86%	32.09%	33.29%	34.20%
Fiber	9.17%	9.24%	9.15%	8.90%	8.63%	8.37%
Lipids	6.21%	6.00%	6.04%	6.31%	7.62%	8.33%
ENN ^h	27.74%	29.89%	27.95%	26.67%	28.98%	28.77%
Gross energy (cal/g) ^j	3984.96	3983.31	3963.33	3932.47	3879.98	3827.49

2435 ^a Leal Santos, Rio Grande, RS, Brazil.

2436 ^b Prilabsa® (RN, Brazil).

2437 ^c Campestre, São Paulo, Brazil.

2438 ^d CMC (Carboxymethylcellulose), Vetec, Rio de Janeiro, Brazil.

2439 ^e Premix, M. Cassab, São Paulo, Brazil (vitamin A (500,000 IU/kg), vitamin D3 (250,000
2440 IU/kg), vitamin E (5000 mg/kg), vitamin K3 (500 mg/kg), vitamin B1 (1000 mg/kg), vitamin
2441 B2 (1000 mg/kg), vitamin B6 (1000 mg/kg), vitamin B12 (2000 µg/kg), niacin (2500 mg/kg),
2442 calcium pantothenate (4000 mg/kg), folic acid (500 mg/kg), biotin (10 mg/kg), vitamin C
2443 (10,000 mg/kg), choline (100,000 mg/kg), and inositol (1000 mg/kg). Trace elements:
2444 selenium (30 mg/kg), iron (5000 mg/kg), copper (1000 mg/kg), manganese (5000 mg/kg),
2445 zinc (9000 mg/kg), cobalt (50 mg/kg), and iodine (200 mg/kg)).

2446 ^f Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil.

2447 ^g MetAmino®DL-methionine, feed grade 99%, Evonik Industries AG, Health & Nutrition,
2448 Hanau, Germany.

2449 ^h Calculated value (Merrill and Watt, 1973). NFE = 100 – (crude protein + lipids + ash +
2450 moisture).

2451 ^j Energy was calculated as 16.7, 16.7 and 37.7 kJ/g of protein, carbohydrate and lipids,
2452 respectively (calculated from physiological fuel values).

2453 2.3 Gram stain

2454 The morphological analyses were performed at the LIPOA (Laboratório de Patologia e
2455 Imunologia de Organismos Aquáticos) of FURG to evaluate the presence of Gram-positive
2456 and Gram– negative bacteria. At the end of the experiment, three shrimps per treatment were
2457 selected and fixed in Davidson’s fixative; after 24 hours, the shrimp were transferred to
2458 alcohol (70%), and the bacterial Gram stain procedure of Hucker and Conn (1923) was
2459 applied. For the Gram stain, the third and fourth muscle sections of the shrimp were dissected
2460 longitudinally and embedded in paraffin blocks. The embedded tissues were then cut into 3
2461 µm sections, placed on slides, and stained according to the aforementioned protocols. The
2462 number of Gram-positive bacteria was estimated by counting the bacteria at 12 locations on
2463 the slides of three shrimp per treatment and was expressed as the mean number of bacteria per
2464 slide in the shrimp intestine (bac/slide). Images of the different slides were taken with a Nikon
2465 microscope E200® equipped with Motic 5.0 MP image capture system using Motic Image
2466 plus 2.0 software.

2467 2.4 Statistical analyses

2468 The results are presented as the means ± standard deviation. One-way analyses of variance
2469 (ANOVA) were applied after testing for normality and homogeneity of variance (normality

2470 was analyzed by a Shapiro-Wilks test, and homogeneity of variance was analyzed by a
 2471 Cochran test). When ANOVA suggested that differences existed between samples, Newman-
 2472 Keuls tests with a 5% significance level were applied (Sokal and Rohlf 1995). In addition, a
 2473 linear regression was created between the diets and the number of bacteria per slide for the
 2474 shrimp gut and was assessed by the coefficient of determination, R^2 .

2475 3 Results

2476 3.1 Water quality parameters

2477 No significant differences were observed in the water quality parameters of the different diet
 2478 groups. The water temperature was maintained at $29\pm 0.1^\circ\text{C}$, the salinity was maintained at 34
 2479 ppt, the dissolved oxygen concentration was maintained at $5.9\pm 0.25\text{ mg L}^{-1}$ and the pH was
 2480 maintained at 8.18 ± 1.9 . The total nitrogen concentration was measured weekly and was
 2481 maintained at $0.44\pm 0.25\text{ mg L}^{-1}$. Nitrite and nitrate were also measured and were maintained
 2482 at levels of $0.015\pm 0.01\text{ mg L}^{-1}$ and $0.025\pm 0.03\text{ mg L}^{-1}$, respectively. Alkalinity levels were
 2483 maintained above $100\text{ mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$, and these levels were corrected once with a lime
 2484 application of 0.05 g L^{-1} to achieve the pH and alkalinity levels indicated for *L. vannamei*
 2485 growth by Furtado et al. (2011).

2486 3.2 Gram stain

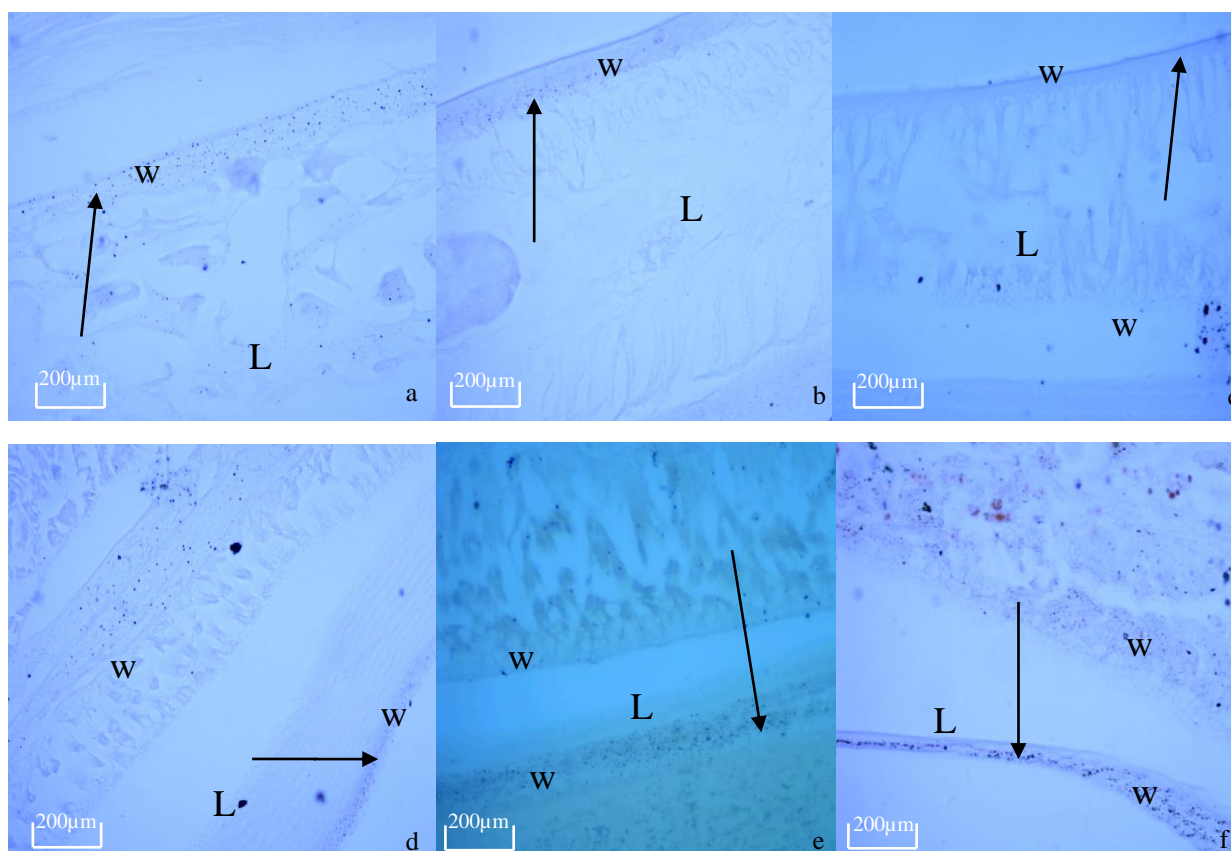
2487 The number of Gram-positive bacteria in the intestines increased according to the *A. platensis*
 2488 levels in the diets. The occurrence of Gram-positive bacteria is shown in Table 2.

2489 Table 2. Gram-positive bacteria counts in shrimp gut on histological slides. The counts were
 2490 made with a $100\times$ optical microscope across twelve points on the shrimp gut. The results are
 2491 expressed as the means \pm SD (bac/slide) (n=3).

Diet	Gram-positive bacteria (bac/slide)
0%	$7.33\pm 3.27\text{ d}$
5%	$22.33\pm 4.32\text{ c}$
10%	$22.83\pm 4.53\text{ c}$
25%	$46.83\pm 5.04\text{ b}$
50%	$51.67\pm 3.93\text{ ab}$
75%	$60.50\pm 10.19\text{ a}$

2492 Different letters in a row indicate significant differences ($p<0.05$).

2493 The Gram stain images of the posterior guts from shrimp in the different treatments are shown
2494 in Figure 1 (a-c). No morphological alterations were detected among the intestines of shrimp
2495 from the different treatments.



Gram stain in slides of posterior intestine of *Litopenaeus vannamei* (treatments: a-0%; b-5%; c-10%; d-25%; e-50% and f-75%); a) low occurrence of Gram- positive bacteria in shrimp fed with 0% *A. platensis* diets; b-f) increasing occurrence of Gram- positive bacteria on intestine wall of shrimp fed with *A. platensis* diets. Images are at 40× magnification. Intestinal lumen (L); gut wall (w); arrows show staining of Gram- positive bacteria.

2496 The results showed a positive linear correlation between the diets and the occurrence of
2497 Gram-positive bacteria in the shrimp intestine. This correlation was expressed by the
2498 regression equation $y = -2.5333 + 10.7952 * x$, $R^2 = 0.88$ ($p < 0.005$).

2499 4. Discussion

2500 The application of new ingredients that increase diet digestibility and shrimp health is a
2501 necessary step to improve the artificial food used in aquaculture. The use of prebiotics in
2502 aquaculture has benefited the performance, health and survival of organisms (Yousefian and

2503 Amiri 2009, Anuta et al. 2016). Prebiotics and different extracts from microalgae have also
2504 been used in aquaculture feed to control the occurrence of bacterial pathogens and viruses.
2505 Cerezuela et al. (2012) reported changes in the diversity of bacterial communities in gilthead
2506 sea bream due to the antimicrobial activity of the microalga *Tetraselmis chuii*. Bhowmik et al.
2507 (2009) disclosed the probiotic value of *Spirulina* improving the lactic acid of bacteria and
2508 inhibiting the growth of pathogens *in vitro*. In our study on Pacific white shrimp fed with *A.*
2509 *platensis*, increasing concentrations of dietary *Spirulina* were related to increases in Gram-
2510 positive bacteria in the gut.

2511 Interestingly, no Gram-negative bacteria were observed in any of the shrimp, irrespective of
2512 the treatment applied. In this work, the water used to rear the shrimp had been previously
2513 treated with chlorine; this water management may explain why Gram-negative bacteria were
2514 absent in the shrimp gut. Norton and LeChevallier (2000) showed that potable water
2515 pretreated with chlorine presented a shift in the bacterial population to predominantly Gram-
2516 positive bacteria. Moreover, a direct relationship between the augmentation of Gram-positive
2517 bacteria and increased dietary *Spirulina* was observed in this study. Thus, a synergistic effect
2518 of water pretreatment with chlorine and the effects of *Spirulina* on bacterial modulation in the
2519 gut cannot be ruled out.

2520 According to Stewart et al. (2006), *Spirulina* is composed of lipopolysaccharides (LPS).
2521 Diverse research indicates that the LPS from different microalgae may promote the
2522 appearance of different bacterial groups beneficial to the shrimp gut, which occupy sites that
2523 could otherwise be colonized by pathogenic bacteria (Anuta et al. 2016, de Jesus Raposo et al.
2524 2016).

2525 The LPS of different microalgae function specifically as strong antigenic substances against
2526 Gram-negative bacteria, inducing the shrimp cellular immune response (Xian et al. 2013,
2527 Xian et al. 2016). Such is the case for *L. vannamei*, which presents higher levels of hemocytes
2528 in the circulation when fed with *Spirulina* (Macias-Sancho et al. 2014).

2529 5. Conclusion

2530 The results presented in this study demonstrate that the replacement of fishmeal by the
2531 microalgae *Arthrospira platensis* promotes the growth of Gram-positive bacteria in the shrimp
2532 gut. Therefore, *A. platensis* appears to act as a prebiotic agent in shrimp, and its capacity to

2533 modulate bacteria in the shrimp gut has been proven. More studies should be conducted to
2534 determine the strains of bacteria that compose the microbiota of shrimp fed with different
2535 levels of *Arthrospira platensis*.

2536 6. Acknowledgements

2537 This work was supported by the National Council for Scientific and Technological
2538 Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel
2539 (CAPES), and Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA). Wasielesky, WJ,
2540 Poersch, LH, Romano, LA and Tesser, MB are research fellows of CNPq.

2541 Compliance with ethical standards

2542 Conflict of interest

2543 The authors declare that they have no conflict of interest.

2544 7. References

2545 Adel M, Yeganeh S, Dadar M, Sakai M, & Dawood, MA (2016) Effects of dietary *Spirulina*
2546 *platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease
2547 resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso Linnaeus*, 1754). *Fish & shellfish*
2548 *immunology*, 56: 436-444

2549 Aminot A, & Chaussepied M (1983) *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*.
2550 CNEXO, Brest, p 379

2551 Anuta JD, Buentello A, Patnaik S, Hume ME, Mustafa A, Gatlin D & Lawrence AL (2016)
2552 Effects of dietary supplementation of a commercial prebiotic Previda® on survival, growth,
2553 immune responses and gut microbiota of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
2554 *Aquaculture nutrition*, 22: 410-418

2555 APHA (American Public Health Association) (1998) Standard methods for the examination of
2556 water and wastewater (20th ed.), Washington, DC

- 2557 Bendschneider K, & Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric method for the
2558 determination of nitrite in sea water. *J Mar Res*, 11: 87–96
- 2559 Bhowmik D, Dubey J, Mehra S (2009) Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* –
2560 stimulating growth of lactic acid bacteria. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 4 (2):
2561 160-163, ISSN 1817-308X
- 2562 Boyd CE, & Tucker CS (1998) Pond aquaculture water quality management. Kluwer
2563 Academic, Boston, p 700
- 2564 Camacho-Rodríguez, J., Macías-Sánchez, M.D., Cerón-García, M.C. et al. *J Appl Phycol*
2565 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1281-5>
- 2566 Cerezuela R, Fumanal M, Tapiá-Paniagua S T, Meseguer J, Moriñigo MÁ, & Esteban, MÁ
2567 (2012) Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream
2568 (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and tissue research*, 350(3),
2569 477-489
- 2570 De Jesus Raposo MF, De Morais AMMB, & De Morais RMSC (2016) Emergent sources of
2571 prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine drugs*, 14: 27
- 2572 FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad
2573 alimentaria y la nutrición para todos, Roma, p 224. ISBN 978-92-5-309185-0
- 2574 Figueiredo-Silva C, Lemme A, Sangsue D, Kiriratnikom S (2015). Effect of DL-methionine
2575 supplementation on the success of almost total replacement of fish meal with soybean meal in
2576 diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*). *Aquac. Nutr.*
2577 21, 234–241 DOI [10.1111/anu.12150](https://doi.org/10.1111/anu.12150)
- 2578 Gamboa-Delgado J, Fernández-Díaz B, Nieto-López M, & Cruz-Suárez LE (2016) Nutritional
2579 contribution of torula yeast and fish meal to the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* as
2580 indicated by natural nitrogen stable isotopes. *Aquaculture*, 453: 116-121
- 2581 Horwitz W, & Latimer G (2000) Official Methods of Analysis of AOAC International,
2582 Gaithersburg MA, USA. Association of Official Analytical chemist
- 2583 Hoseini S, Khosravi-Darani K, & Mozafari M (2013) Nutritional and medical applications of
2584 *Spirulina* microalgae. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13: 1231-1237

2585 Huckler GJ, & Conn HJ (1923). Methods of gram staining, technical bulletin of the New York
2586 state. Agric Exp Stn, p 93

2587 Huo Y, Zeng W, Jin M, Li M, Xie F, & Zhou Q (2014) Methionine Requirement of Juvenile
2588 Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 12: 022

2589 Jory DE, Cabrera TR, Dugger DM, Fegan D, Lee PG, Lawrence AL, Jackson CJ,
2590 Mcintosh RP, Castañeda J (2001). A global review of shrimp feed management: status
2591 and perspectives. In: Browdy CL, Jory DE (Eds.) The New Wave, Proceedings of the
2592 Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture. The World Aquaculture
2593 Society, Baton Rouge, LA, pp. 104–152

2594 Macias-Sancho J, Poersch LH, Bauer W, Romano LA, Wasielesky W, & Tesser MB (2014)
2595 Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus*
2596 *vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. Aquaculture, 426-427: 120-125.
2597 DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.028>

2598 Millamena OM, Teruel M, Kanazawa A, & Teshima S (1999) Quantitative dietary
2599 requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine,
2600 phenylalanine and tryptophan. Aquaculture, 179: 169-179

2601 Neyrinck AM, Taminau B, Walgrave H, Daube G, Cani PD, Bindels LB, & Delzenne NM
2602 (2017) Spirulina Protects against Hepatic Inflammation in Aging: An Effect Related to the
2603 Modulation of the Gut Microbiota? Nutrients, 9: 633

2604 Norton CD, & LeChevallier MW (2000) A pilot study of bacteriological population changes
2605 through potable water treatment and distribution. J Appl Environ Microbiol., 66(1), 268-276

2606 Radonic A, Thulke S, Achenbach J, Kurth A, Vreemann A, König T, Walter C, Possinger K,
2607 & Nitsche A (2010) Anionic polysaccharides from phototrophic microorganisms exhibit
2608 antiviral activities to *Vaccinia virus*. J. Antivir. Antiretrovir. 2(4): 51–55. DOI
2609 10.4172/jaa.1000023

2610 Raposo MF, De Morais RM, & Bernardo De Morais AM (2013) Bioactivity and applications
2611 of sulphated polysaccharides from marine microalgae. Marine Drugs, 11: 233-52. DOI
2612 10.3390/md11010233

- 2613 Stewart I, Schluter PJ. & Shaw GR (2006). Cyanobacterial lipopolysaccharides and human
2614 health—a review. *Environmental Health*, 5: 7
- 2615 Tacon AGJ, & Metian M (2015) Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture.
2616 *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23: 1-10. DOI 10.1080/23308249.2014.987209
- 2617 Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, & Thomas J (2016) Seaweeds as an
2618 alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*, 464: 529-536
- 2619 Xian JA, Miao YT, Li B, Guo H, & Wang AL (2013) Apoptosis of tiger shrimp (*Penaeus*
2620 *monodon*) haemocytes induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Comp Biochem*
2621 *Physiol A Mol Integr Physiol*, 164: 301-6. DOI 10.1016/j.cbpa.2012.10.008
- 2622 Xian JA, Zhang XX, Guo H, Wang DM,. & Wang AL (2016) Cellular responses of the tiger
2623 shrimp *Penaeus monodon* haemocytes after lipopolysaccharide injection. *Fish Shellfish*
2624 *Immunol.*, 54: 385-390
- 2625 Yousefian M, & Amiri MS (2009) A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and
2626 shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8: 7313–7318

2627 **DICUSSÃO GERAL**

2628 As pesquisas realizadas nos diferentes capítulos mantiveram o propósito de aumentar
2629 o uso da microalga *Arthrospira platensis* para os sistemas de produção do camarão branco
2630 *Litopenaeus vannamei*.

2631 Os bioflocos são conglomerados microbianos, que estão compostos por fitoplâncton,
2632 zooplâncton, bactérias e detritos em forma de matéria suspensa e agregados de partículas
2633 (Krummenauer et al., 2011). Devido a tais características, o primeiro estudo desta tese visou
2634 avaliar a capacidade da microalga *A. platensis* em pó ou viva de ser incluída como parte dos
2635 agregados microbianos utilizados no sistema de produção superintensiva nos berçários de
2636 camarão marinho e os efeitos da microalga na sobrevivência do camarão *L. vannamei*. A
2637 microalga e os compostos da mesma podem aumentar o poder nutricional dos conglomerados
2638 bacterianos além de agregar os efeitos imunoestimulantes próprios da *A. platensis*.
2639 Obtiveram-se melhores resultados de sobrevivência nos tratamentos em que houve
2640 suplementação com a microalga no sistema de produção com bioflocos. Provavelmente isto
2641 ocorreu em função da quantidade de carotenóides (Yamada et al., 1990) e natureza fitobiótica
2642 da microalga (Abdel-Daim et al., 2016).

2643 Durante a fase de berçário, o sistema biofoco permite utilizar altas densidades de
2644 camarões e diminuir os custos de produção, além de aumentar o número de safras em áreas de
2645 clima temperado (Wasielesky Jr et al., 2013). O sistema de biofoco mistura a retirada de
2646 nutrientes da água com a produção de biomassa microbiana (Krummenauer et al., 2011), o
2647 qual também serve como fonte de proteínas suplementar (Wasielesky Jr et al., 2013;
2648 Emerenciano et al., 2012). O conteúdo de proteínas do biofoco normalmente varia entre 31e
2649 43% (Emerenciano et al., 2011; Wasielesky et al., 2006; Suita et al., 2015), contrariamente a
2650 esses valores, o resultado da proteína do biofoco controle e do tratamento com adição de pó
2651 de *A. platensis* deste estudo foram menores. Cabe destacar que a decomposição dos biofocos
2652 nos tanques pode implicar na perda da qualidade nutricional e na redução do nível protéico
2653 dos mesmos. Apesar dos resultados, a sobrevivência se viu favorecida sempre que a microalga
2654 estava presente no sistema, validando assim o possível efeito imuno-estimulante no sistema de
2655 defesa inato dos camarões.

2656 Como primeira premissa se apresenta a capacidade do *L. vannamei* de utilizar as
2657 microalgas suspensas na coluna da água como fonte básica de nutrientes (Gamboa-Delgado,
2658 2014). A entrada de nitrogênio na água para os tratamentos onde foi incluída a microalga

2659 deveria ser maior, visto a incorporação de ingrediente com alto conteúdo de proteína no meio.
2660 No entanto, a comunidade microbiana própria de cada unidade experimental evitou o aumento
2661 brusco das concentrações dos compostos nitrogenados. Para o tratamento onde foi incluída a *A.*
2662 *platensis* viva a amônia atingiu valores acima dos recomendados para o desenvolvimento da
2663 espécie, mas não provocou mortalidades provavelmente devido aos efeitos imunoestimulantes
2664 da *A. platensis*.

2665 Diferentes pesquisas obtiveram sucesso quando utilizaram diversas microalgas em co-
2666 cultivo de camarão marinho para manter a qualidade da água (Ge et al., 2016; Chuntapa et al.,
2667 2003; Pallaoro et al., 2016). Nesse contexto, o objetivo do segundo capítulo foi avaliar a
2668 qualidade de água, crescimento, sobrevivência e as respostas do sistema imunológico em
2669 sistemas de coprodução de juvenis de *L. vannamei* e *A. platensis*. Os dados obtidos inferem os
2670 efeitos benéficos da inclusão de biomassa da cianobactéria *A. platensis* no crescimento e no
2671 sistema imunológico do camarão branco. Em contrapartida, não se obteve sucesso na
2672 produção de *A. platensis*. Esse resultado provavelmente foi originado pelas densidades
2673 elevadas de produção de camarão e o tamanho das unidades experimentais.

2674 A microalga *A. platensis* é uma fonte importante de nutriente para o organismo devido
2675 ao alto teor protéico (Gershwin & Belay, 2007) e a alta digestibilidade (Sasson, 1997; De
2676 Oliveira et al., 2013), sendo as características que podem explicar o bom desempenho dos
2677 organismos que se alimentaram com a microalga.

2678 Pesquisas anteriores que avaliaram os efeitos da aplicação de compostos provenientes
2679 da microalga *A. platensis*, concluíram a efetividade dos mesmos na defesa frente a infecções
2680 de vibrios (Tayag et al., 2010) e episódios de estresse (Lin et al., 2010) em camarões
2681 marinhos. Em termos gerais, essas pesquisas confirmaram os efeitos imunoestimulantes da *A.*
2682 *platensis* já adiantados no século anterior por Belay et al. (1996) e (Cuzon et al., 1981) tanto
2683 para humanos quanto para camarões marinhos respectivamente. O camarão branco do
2684 Pacífico tem o sistema imunológico inato como mecanismo de defesa (Barraco et al., 2008).
2685 O estado do sistema imunológico pode ser avaliado por diferentes parâmetros como o
2686 conteúdo de hemócitos e a quantidade de proteína na hemolinfa. A concentração de proteína
2687 na hemolinfa serve como um dos indicadores do estado de saúde dos camarões (Perazzolo et
2688 al., 2002; Rubio-Gastélum et al., 2014). Os hemócitos hialinos e granulares formam parte do
2689 sistema imunológico dos crustáceos e são encarregados da fagocitose, encapsulação,
2690 formação de nódulos e citotoxicidade (Barraco et al., 2008). A apoptose celular é considerada
2691 como principal mecanismo de resposta imunológica encarregado de retirar as células danadas

2692 e infectadas que não passaram por processos inflamatórios (Terahara & Takahashi, 2008).
2693 Esses indicadores do sistema imunológico no final do experimento denotam o bom estado
2694 imunológico dos animais alimentados com *A. platensis* e coincidem com os resultados obtidos
2695 por Chang et al. (2009); Xian et al. (2012); Fan et al. (2013) e Li et al. (2014) que indicam
2696 uma melhor preparação do sistema imunológico dos organismos aquáticos.

2697 As dietas para peixes no futuro incluirão uma maior variedade de ingredientes
2698 alternativos da farinha de peixe dos que são utilizados atualmente (Glencross et al., 2007).
2699 Nos últimos anos, foram testadas como substitutos da farinha de peixe, a farinha de carne, de
2700 ossos e de penas (Forster et al., 2003; Samocha et al., 2004; Cruz-Suárez et al., 2007), além de
2701 fontes vegetais (Oujifard et al., 2015; Olvera-Novoa et al., 1990; Cruz-Suarez et al., 2001).
2702 Ainda é procurado o uso de ingredientes que, além de ter alto valor nutricional, possam ser
2703 estimulantes da saúde dos organismos cultivados. Desta forma, os objetivos do terceiro e
2704 quarto estudos visaram avaliar a substituição de farinha de peixe por farinha de *A. platensis* e
2705 conferir os efeitos como prebiótico, no crescimento, no sistema imunológico, na coloração, no
2706 conteúdo de carotenóides e no sistema antioxidante do camarão branco do Pacífico.

2707 Macias-Sancho et al. (2014) observaram que era possível substituição de até 75% da
2708 farinha de peixe pela farinha de microalga *A. platensis* gerando benefícios ao sistema
2709 imunológico sem afetar o crescimento dos camarões. Com base nestes resultados foram
2710 formuladas dietas com altos níveis de substituição de farinha de peixe por farinha de
2711 microalga para verificar alterações no sistema imunológico, possíveis mudanças na coloração
2712 do músculo e alterações na capacidade antioxidante dos camarões. Os resultados confirmaram
2713 a melhora no crescimento de camarões alimentados com os três níveis maiores de substituição
2714 da farinha de peixe pela farinha de *A. platensis*, provavelmente devido a maior
2715 disponibilidade de proteína fornecida pela ingestão da microalga e a maior efetividade na
2716 síntese de proteína (Belghit et al., 2014; Skiba-Cassy et al., 2016). Os mesmos efeitos na
2717 deposição de proteína no músculo foram reportados por (Palmegiano et al., 2008; Palmegiano
2718 et al., 2005; Kim et al., 2013; Macias-Sancho et al., 2014). Além da alta digestibilidade da
2719 proteína oriunda da *A. platensis* (Sasson, 1997; De Oliveira et al., 2013), a cianobactéria
2720 possui alto conteúdo de carotenóides (Gershwin & Belay, 2007). Segundo Meyers (2000) os
2721 carotenóides são fonte importante de vitamina A, e sua deficiência afeta o crescimento do *L.*
2722 *vannamei* (He et al., 1992). Dessa forma, as rações formuladas com *A. platensis* contêm um
2723 nível alto de carotenóides, evitando os efeitos negativos no crescimento de *L. vannamei*.

2724 Em adição, foram observadas mudanças na coloração dos animais, que adquiriram
2725 tonalidades mais escuras quando alimentados com dietas com maiores níveis de inclusão da
2726 microalga. Esses dados concordam com os resultados obtidos por (Lorenz, 1998; Olvera-
2727 Novoa et al., 1998; James et al., 2006; Divya et al., 2014; Radhakrishnan et al., 2016).

2728 Do ponto de vista imunológico, a microalga *A. platensis* contém ficocianina a qual
2729 consegue regular a apoptoses celular (Shih et al., 2003). Sendo a apoptose um importante
2730 processo de resposta imunológica. Em camarões é utilizada na eliminação de células em
2731 excesso, danificadas ou potencialmente perigosas (Sahtout et al., 2001; Terahara e Takahashi,
2732 2008; Xian et al., 2016).

2733 Também foram descritos efeitos positivos no sistema imunológico dos compostos
2734 desta microalga tais como: aumento de proteína na hemolinfa e número de hemócitos.
2735 Segundo Sunila e LaBanca (2003), o processo de apoptose ocorre provavelmente como
2736 processo de renovação dos hemócitos no sistema de defesa, provocando um incremento no
2737 número do hemócitos. Esses incrementos de hemócitos concordam com os dados de pesquisas
2738 anteriores sinalando os efeitos positivos da microalga sobre o sistema de defesa inato de
2739 crustáceos (Tayag et al., 2010; Lin et al., 2010).

2740 Análogo aos efeitos benéficos causado pelos compostos da microalga *A. platensis* no
2741 sistema imune inato dos camarões, também foram registrados efeitos benéficos na eliminação
2742 de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gutiérrez-Rebolledo et al., 2015; Martínez-Palma et
2743 al., 2015). Os diversos compostos que constituem a *A. platensis* como os lipopolissacarídeos
2744 (LPS) (Lin et al., 2015), ficocianina (Romay et al., 2001) e carotenóides (Regunathan e
2745 Wesley, 2006) tem efeitos antioxidantes (Miranda et al., 1998). Esses efeitos discordam com
2746 os dados obtidos no estudo realizado. Por outro lado, os resultados de dano oxidativo
2747 aumentaram em relação ao aumento da inclusão de *A. platensis* nas dietas, obtendo dados de
2748 peroxidação lipídica contrários aos obtidos por outros pesquisadores (Teimouri et al., 2016;
2749 Lu et al., 2006). Esse mesmo efeito de aumento na peroxidação com o aumento no consumo
2750 de microalga obtido nesse estudo foi descrito anteriormente por Dal Bosco et al. (2014),
2751 sendo atribuído a ficocianina, que presente em grandes quantidades na microalga, gera efeitos
2752 pro-oxidantes (Macari et al., 2011). Apesar do dano oxidativo gerado pelo excesso de *A.*
2753 *platensis* este não afetou o desempenho zootécnico dos crustáceos.

2754 As algas e microalgas incluem polissacarídeos que podem ser utilizados como
2755 potenciais prebióticos inclusos na alimentação (Jesus Raposo et al., 2016). Os LPS associados
2756 às cianobactérias não são todos prejudiciais (Stewart et al., 2006). Esses LPS foram achados

2757 nas paredes dos intestinos de animais alimentados com altos níveis de substituição coincidem
2758 com o aumento de bactérias Gram positivas (Bhowmik et al., 2009) e inibição de bactérias
2759 Gram negativas (Xian et al., 2013; Xian et al., 2016). De acordo com Martínez-Palma et al.
2760 (2015) a liberação de peptídeos de pequeno tamanho oriundos das proteínas da *A. platensis*
2761 apresentam atividade quelante sobre o Cu^{+2} e Fe^{+2} , capazes de participar na fixação de
2762 bactérias benéficas carregadas com esses íons. Incluir a microalga na dieta como substância
2763 probiótica vem sendo testado com sucesso favorecendo o desempenho e a saúde de diferentes
2764 animais produzidos em cativeiro (Mariey et al., 2012; Mariey et al., 2014), resultados
2765 semelhantes aos encontrados por Tominaga et al. (2013) e Jamil et al. (2015) indicaram os
2766 efeitos protetores no sistema digestivo de humanos e frangos respectivamente. Na presente
2767 pesquisa se obteve uma correlação positiva entre o crescimento dos camarões e a quantidade
2768 de bactérias Gram positiva depositada no intestino dos camarões.

2769 **CONCLUSÕES GERAIS**

2770 As pesquisas realizadas nesta tese visaram avaliar as diferentes aplicações e efeitos no
2771 crescimento, na coloração, sistema imunológico e dano oxidativo dos diferentes estados de
2772 microalga *Arthrospira platensis* no sistema de produção de camarão branco *Litopenaeus*
2773 *vannamei*.

2774 Na aplicação da microalga viva no cultivo de camarão marinho foram encontradas
2775 diferentes limitações para o sistema de engorda, sendo aconselhável a utilização de
2776 densidades semi-intensivas para o bom manejo da qualidade da água.

2777 À partir dos resultados obtidos, é possível afirmar os efeitos benéficos para a saúde
2778 dos crustáceos da microalga tanto na forma viva quanto em pó, como elemento enriquecedor
2779 na água de cultivo atingindo maiores resultados na sobrevivência.

2780 A microalga *A. platensis* serve como substituto eficiente da farinha de peixe para
2781 rações de camarão até níveis de 75% sem provocar efeitos deletérios no desenvolvimento dos
2782 camarões e melhorar o sistema imunológico dos mesmos. No referente à substituição da
2783 farinha de peixe pela microalga *Arthrospira platensis*, os resultados obtidos permitem
2784 aconselhar o uso do nível de substituição de 75% sempre que sejam respeitados os níveis de
2785 metionina aconselhados por estudos anteriores. Essa elevada substituição poderá colaborar na
2786 redução de dependência da farinha de peixe para a produção de rações balanceadas utilizadas
2787 na aquicultura.

2788 A coloração avermelhada do camarão branco foi atingida quando a microalga foi
2789 incluída nas rações, sendo uma estratégia viável para aumentar a cor dos camarões
2790 convertendo o produto mais atrativo para o consumidor.

2791 A microalga *A. platensis* pode ser utilizada como probiótico, uma vez que apresenta
2792 compostos que inibem a presença de bactérias patogênicas e estimula o desenvolvimento de
2793 bactérias benéficas no trato digestório do camarão branco do Pacífico.

2794 A substituição de níveis superiores a 50% de farinha de peixe por farinha de microalga
2795 na formulação de rações para *L. vannamei* aumenta o dano oxidativo sem influenciar no
2796 crescimento do camarão.

2797 REFERÊNCIAS

2798 Abdel-Daim M, El-Bialy BE, Rahman HG, Radi AM, Hefny HA, Hassan AM (2016)
2799 Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in
2800 mice: Biochemical and histopathological studies. *Biomed Pharmacother*, 77, 79-85.

2801 Barraco M, Perazzolo M L, Rosa R (2008) Inmunología de crustáceos, con énfasis en
2802 camarones. MORALES V. *Patología e inmunología del camarón blanco *Pennaeus**
2803 *vannamei*. Panamá: CYTED.

2804 Belay A, Kato T, Ota Y (1996) *Spirulina* (Arthrospira): potential application as an animal
2805 feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8, 303-311.

2806 Belghit I, Skiba-Cassy S, Geurden I, Dias K, Surget A, Kaushik S, Panserat S, Seiliez I
2807 (2014) Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle
2808 protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*,
2809 112, 493-503.

2810 Bhowmik D, Dubey J, Mehra S (2009) Probiotic efficiency of *Spirulina platensis*-stimulating
2811 growth of lactic acid bacteria. *World J. Dairy Food Sci*, 4, 160-163.

2812 Chang C-C, Yeh M-S, Cheng W (2009) Cold shock-induced norepinephrine triggers
2813 apoptosis of haemocytes via caspase-3 in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
2814 *Fish & shellfish immunology*, 27, 695-700.

2815 Chuntapa B, Powtongsook S, Menasveta P (2003) Water quality control using *Spirulina*
2816 *platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220, 355-366.

2817 Cruz-Suárez LE, Nieto-López M, Guajardo-Barbosa C, Tapia-Salazar M, Scholz U, Ricque-
2818 Marie D (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical

2819 diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets.
2820 *Aquaculture*, 272, 466-476.

2821 Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, McCallum IM, Hickling D (2001)
2822 Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal
2823 (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196, 87-
2824 104.

2825 Cuzon G, Santos RD, Hew M, Poullaouec G (1981) Use of *Spirulina* in Shrimp (*Penaeus*
2826 *japonicus*) diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, 12, 282-291.

2827 Dal Bosco A, Gerencsér Z, Szendrő Z, Mugnai C, Cullere M, Kovács M, Ruggeri S, Mattioli
2828 S, Castellini C, Dalle Zotte A (2014) Effect of dietary supplementation of *Spirulina*
2829 (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance,
2830 oxidative stability and fatty acid profile during retail display. *Meat science*, 96, 114-
2831 119.

2832 de Jesus Raposo MF, de Morais AMMB, de Morais RMSC (2016) Emergent sources of
2833 prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine drugs*, 14, 27.

2834 De Oliveira CA, de Oliveira Campos AA, Ribeiro SMR, de Castro Oliveira W, do
2835 Nascimento AG (2013) Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria
2836 *spirulina*. *Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN*, 5, 52-59.

2837 Divya K, Isamma A, Arunjith T, Sureshkumar S, Krishnakumar V (2014) Effect of enriched
2838 *Artemia franciscana* on production, survival, growth and biochemical composition of
2839 the freshwater fish *Catla* (Hamilton, 1922). *International Journal of Recent*
2840 *Biotechnology*, 2, 15-24.

2841 Emerenciano M, Ballester EL, Cavalli RO, Wasielesky W (2011) Effect of biofloc technology
2842 (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth
2843 performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*,
2844 19, 891-901.

2845 Emerenciano M, Ballester EL, Cavalli RO, Wasielesky W (2012) Biofloc technology
2846 application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink
2847 shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture research*, 43, 447-
2848 457.

2849 Fan L, Wang A, Wu Y (2013) Comparative proteomic identification of the hemocyte response
2850 to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of proteomics*, 80, 196-
2851 206.

2852 Forster I, Dominy W, Obaldo L, Tacon A (2003) Rendered meat and bone meals as
2853 ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*,
2854 219, 655-670.

2855 Gamboa-Delgado J (2014) Nutritional role of natural productivity and formulated feed in
2856 semi-intensive shrimp farming as indicated by natural stable isotopes. *Reviews in*
2857 *Aquaculture*, 6, 36-47.

2858 Ge H, Li J, Chang Z, Chen P, Shen M, Zhao F (2016) Effect of microalgae with
2859 semicontinuous harvesting on water quality and zootechnical performance of white
2860 shrimp reared in the zero water exchange system. *Aquacultural Engineering*, 72-73,
2861 70-76.

2862 Gershwin ME, Belay A (2007) *Spirulina in human nutrition and health*, CRC press.

2863 Glencross B, Booth M, Allan G (2007) A feed is only as good as its ingredients—a review of
2864 ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*, 13, 17-
2865 34.

2866 Gutiérrez-Rebolledo GA, Galar-Martínez M, García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos GA,
2867 Hernández-Reyes AG, Martínez-Galero E (2015) Antioxidant effect of *Spirulina*
2868 (*Arthrospira*) *maxima* on chronic inflammation induced by Freund's complete adjuvant
2869 in rats. *Journal of medicinal food*, 18, 865-871.

2870 He H, Lawrence AL, Liu R (1992) Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins,
2871 A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 103, 177-185.

2872 James R, Sampath K, Thangarathinam R, Vasudevan I (2006) Effect of dietary spirulina level
2873 on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus*
2874 *helleri*.

2875 Jamil ABM, Akanda M, Rahman M, Hossain M, Islam M (2015) Prebiotic competence of
2876 spirulina on the production performance of broiler chickens. *Journal of Advanced*
2877 *Veterinary and Animal Research*, 2, 304.

2878 Kim S-S, Rahimnejad S, Kim K-W, Lee K-J (2013) Partial replacement of fish meal with
2879 *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of*
2880 *Fisheries and Aquatic Sciences*, 13.

2881 Krummenauer D, Peixoto S, Cavalli RO, Poersch LH, Wasielesky W (2011) Superintensive
2882 culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in
2883 southern Brazil at different stocking densities. *Journal of the World Aquaculture*
2884 *Society*, 42, 726-733.

- 2885 Li B, Xian J-A, Guo H, Wang A-L, Miao Y-T, Ye J-M, Ye C-X, Liao S-A (2014) Effect of
2886 temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus*
2887 *vannamei*. *Aquaculture international*, 22, 761-774.
- 2888 Lin Y-C, Chen J-C, Chen Y-Y, Yeh S-T, Chen L-L, Huang C-L, Hsieh J-F, Li C-C (2015)
2889 Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and
2890 resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & shellfish*
2891 *immunology*, 45, 104-111.
- 2892 Lin Y-C, Tayag CM, Huang C-L, Tsui W-C, Chen J-C (2010) White shrimp *Litopenaeus*
2893 *vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier
2894 recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish &*
2895 *shellfish immunology*, 29, 1092-1098.
- 2896 Lorenz RT (1998) A review of *Spirulina* as a carotenoid and vitamin source for cultured
2897 shrimp. *Spirulina Pacifica Technical Bulletin*, 4.
- 2898 Lu H-K, Hsieh C-C, Hsu J-J, Yang Y-K, Chou H-N (2006) Preventive effects of *Spirulina*
2899 *platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress.
2900 *European journal of applied physiology*, 98, 220.
- 2901 Macari V, Putin V, Gudumac V, Rudic V, Macari A, Pavlicenco N (2011) The Influence of
2902 the BioR Remedy Administration on the Prooxidant (oxidant)—Antioxidant System
2903 Parameters in Broilers. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences &*
2904 *Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 68.
- 2905 Macias-Sancho J, Poersch LH, Bauer W, Romano LA, Wasielesky W, Tesser MB (2014)
2906 Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for
2907 *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters.
2908 *Aquaculture*, 426-427, 120-125.
- 2909 Mariey Y, Samak H, Abou-Khashba H, Sayed M, Abou-Zeid A (2014) Effect of using
2910 *Spirulina platensis* algae as a feed additives for poultry diets: 2 productive
2911 performance of broiler. *Egypt. Poult. Sci*, 34, 245-258.
- 2912 Mariey Y, Samak H, Ibrahim M (2012) Effect of using *Spirulina platensis* algae as a feed
2913 additive for poultry diets. 1. Productive and reproductive performances of local laying
2914 hens. *Egypt. Poult. Sci*, 32, 201-215.
- 2915 Martínez-Palma N, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G (2015) Determinación de actividad
2916 antioxidante y quelante de hidrolizados proteicos de espirulina (*Arthrospira maxima*)

2917 obtenidos por simulación de digestión gastrointestinal. *Revista mexicana de ingeniería*
2918 *química*, 14, 25-34.

2919 Meyers SP (2000) Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas.
2920 *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de*
2921 *Nutrición Acuícola, La Paz, BCS, México*, 473-491.

2922 Miranda M, Cintra R, Barros S, Mancini-Filho J (1998) Antioxidant activity of the microalga
2923 *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 31, 1075-
2924 1079.

2925 Olvera-Novoa MA, Campos SG, Sabido MG, Palacios CAM (1990) The use of alfalfa leaf
2926 protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis*
2927 *mossambicus*). *Aquaculture*, 90, 291-302.

2928 Olvera-Novoa MA, Dominguez-Cen LJ, Olivera-Castillo L, Martinez-Palacios CA (1998)
2929 Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets
2930 for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*, 29, 709-
2931 715.

2932 Oujifard A, Seyfabadi J, Abedian Kenari A, Rezaei M (2015) Growth response and tail-
2933 muscle fatty acid quality of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed
2934 with diets containing different levels of rice protein concentrate. *Iranian Journal of*
2935 *Fisheries Sciences*, 14, 188-200.

2936 Pallaoro MF, do Nascimento Vieira F, Hayashi L (2016) *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales)
2937 as co-feed for Pacific white shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3659-3665.

2938 Palmegiano GB, Agradi E, Forneris G, Gai F, Gasco L, Rigamonti E, Sicuro B, Zoccarato I
2939 (2005) *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*).
2940 *Aquaculture Research*, 36, 188-195.

2941 Palmegiano GB, Gai F, Daprà F, Gasco L, Pazzaglia M, Peiretti PG (2008) Effects of
2942 *Spirulina* and plant oil on the growth and lipid traits of white sturgeon (*Acipenser*
2943 *transmontanus*) fingerlings. *Aquaculture research*, 39, 587-595.

2944 Perazzolo LM, Gargioni R, Ogliari P, Barracco MA (2002) Evaluation of some hemato-
2945 immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to
2946 environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214, 19-33.

2947 Radhakrishnan S, Belal IE, Seenivasan C, Muralisankar T, Bhavan PS (2016) Impact of
2948 fishmeal replacement with *Arthrospira platensis* on growth performance, body

2949 composition and digestive enzyme activities of the freshwater prawn, *Macrobrachium*
2950 *rosenbergii*. *Aquaculture reports*, 3, 35-44.

2951 Regunathan C, Wesley S (2006) Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using
2952 *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*, 12, 425-432.

2953 Romay C, Remírez D, González R (2001) Actividad antioxidante de la ficocianina frente a
2954 radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Revista Cubana de*
2955 *Investigaciones Biomédicas*, 20, 38-41.

2956 Rubio-Gastélum D, Valenzuela-Quiñónez W, Parra-Bracamonte GM, Santamaria-Miranda A
2957 (2014) Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón
2958 blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio.
2959 *Revista de biología marina y oceanografía*, 49, 601-606.

2960 Sahtout AH, Hassan M, Shariff M (2001) DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in
2961 cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus
2962 (WSSV). *Diseases of aquatic organisms*, 44, 155-159.

2963 Samocha TM, Davis DA, Saoud IP, DeBault K (2004) Substitution of fish meal by co-
2964 extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white
2965 shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 231, 197-203.

2966 Sasson A (1997) Microalgal Biotechnologies: Recent developments and prospects for
2967 developing countries. In: 2. *Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3.*
2968 *Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Phuket (Thailand), 7-10 May 1997.*

2969 Shih SR, Tsai KN, Li YS, Chueh CC, Chan EC (2003) Inhibition of enterovirus 71-induced
2970 apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*.
2971 *Journal of Medical Virology*, 70, 119-125.

2972 Skiba-Cassy S, Geurden I, Panserat S, Seiliez I (2016) Dietary methionine imbalance alters
2973 the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid
2974 metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 454,
2975 56-65.

2976 Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR (2006) Cyanobacterial lipopolysaccharides and human
2977 health—a review. *Environmental Health*, 5, 7.

2978 Suita SM, Ballester EL, Abreu PC, Wasielesky Jr W (2015) Dextrose as carbon source in the
2979 culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero exchange system/Dextrosa
2980 como fuente de carbono en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en un
2981 sistema sin recambio de agua. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43, 526.

- 2982 Sunila I, LaBanca J (2003) Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern
2983 oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of aquatic organisms*, 56, 163-170.
- 2984 Tayag CM, Lin Y-C, Li C-C, Liou C-H, Chen J-C (2010) Administration of the hot-water
2985 extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp
2986 *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish*
2987 *immunology*, 28, 764-773.
- 2988 Teimouri M, Yeganeh S, Amirkolaie A (2016) The effects of *Spirulina platensis* meal on
2989 proximate composition, fatty acid profile and lipid peroxidation of rainbow trout
2990 (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Aquaculture Nutrition*, 22, 559-566.
- 2991 Terahara K, Takahashi KG (2008) Mechanisms and immunological roles of apoptosis in
2992 molluscs. *Current pharmaceutical design*, 14, 131-137.
- 2993 Tominaga A, Konishi Y, Taguchi T, Fukuoka S, Kawaguchi T, Noda T, Shimizu K (2013)
2994 Autonomous cure of damaged human intestinal epithelial cells by TLR2 and TLR4-
2995 dependent production of IL-22 in response to *Spirulina* polysaccharides. *International*
2996 *immunopharmacology*, 17, 1009-1019.
- 2997 Wasielesky Jr W, Froes C, Fóes G, Krummenauer D, Lara G, Poersch L (2013) Nursery of
2998 *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and
2999 compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*, 32, 799-806.
- 3000 Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL (2006) Effect of natural production in a
3001 zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for
3002 white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-403.
- 3003 Xian J-A, Miao Y-T, Li B, Guo H, Wang A-L (2013) Apoptosis of tiger shrimp (*Penaeus*
3004 *monodon*) haemocytes induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Comparative*
3005 *Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164, 301-
3006 306.
- 3007 Xian J-A, Wang A-L, Hao X-M, Miao Y-T, Li B, Ye C-X, Liao S-A (2012) In vitro toxicity
3008 of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric
3009 analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*
3010 *Pharmacology*, 156, 75-79.
- 3011 Xian JA, Zhang XX, Guo H, Wang DM, Wang AL (2016) Cellular responses of the tiger
3012 shrimp *Penaeus monodon* haemocytes after lipopolysaccharide injection. *Fish*
3013 *Shellfish Immunol*, 54, 385-390.
- 3014

3015 Yamada S, Tanaka Y, Sameshima M, Ito Y (1990) Pigmentation of prawn (*Penaeus*
3016 japonicus) with carotenoids: I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and
3017 canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87, 323-330.

