

Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae)

[*Prebiotic, probiotic and symbiotic for Trichogaster leeri larvae (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae)*]

R.V. Azevedo, J.C. Fosse Filho, S.L. Pereira, D.R. Andrade, M.V. Vidal Júnior

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Campos dos Goytacazes, RJ

RESUMO

Avaliou-se a suplementação de prebiótico (mananoligossacarídeo – 2g/kg), probiótico (*Bacillus subtilis*, Cohn, 1872, Bacillales, Bacillaceae – 2g/kg) e simbiótico (mananoligossacarídeo – 2g/kg + *B. subtilis* – 2g/kg), em rações para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae), durante a transição alimentar, sobre o crescimento, a sobrevivência, a morfometria intestinal e a resistência ao estresse por exposição aérea. Para isso, 420 larvas (0,45±0,05mg) foram distribuídas em 20 aquários (3,5L), em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições, durante 28 dias, a saber: 12 dias de alimento vivo (AV) + oito dias de coalimentação (AV + ração controle) + oito dias de ração controle; 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração prebiótico) + oito dias de ração prebiótico; 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração probiótico) + oito dias de ração probiótico; 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração simbiótico) + oito dias de ração simbiótico; 28 dias de AV. Larvas que receberam apenas AV apresentaram resultados de desempenho zootécnico significativamente superiores às larvas dos demais tratamentos, exceto para taxa de crescimento específico em comprimento e sobrevivência, que foram semelhantes aos resultados obtidos por larvas que receberam rações suplementadas com simbiótico. Larvas que receberam a ração controle apresentaram resultados significativamente inferiores para altura das vilosidades intestinais e taxa de resistência ao estresse comparando-se aos demais tratamentos. Os resultados deste estudo indicam que a suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico exerce efeito positivo sobre a sobrevivência, a morfometria intestinal e a resistência ao estresse em larvas de *T. leeri*, no entanto somente a suplementação com simbiótico resulta em melhora no crescimento.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, mananoligossacarídeo, peixes ornamentais, transição alimentar

ABSTRACT

The prebiotic (mannan oligosaccharide – 2g/kg), probiotic (Bacillus subtilis Cohn, 1872, Bacillales, Bacillaceae – 2g/kg) and symbiotic (mannan oligosaccharide - 2g/kg + Bacillus subtilis – 2g/kg) supplementation in diets during food transition in Trichogaster leeri (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae) larvae on growth, survival, intestinal morphology and stress resistance to air exposure was evaluated. For this, 420 larvae (0.45±0.05mg) were distributed in 20 aquaria (3.5L) in a completely randomized design with five treatments and four replications for 28 days, namely: 12 days of live food (LF) + eight days of co-feeding (LF + control diet) + eight days of control diet; 12 days of LF + eight days of co-feeding (LF + prebiotic feed) + eight days of prebiotic feed; 12 days of LF + eight days of co-feeding (LF + probiotic feed) + eight days of probiotic feed; 12 days of LF + eight days of co-feeding (LF + symbiotic feed) + eight days symbiotic feed; 28 days of LF. Larvae fed only LF showed growth performance significantly higher than the larvae of other treatments, except for specific growth rate in length and survival that were similar to the results obtained by larvae fed diets symbiotically

supplemented. Larvae fed the control diet showed significantly lower results for height of intestinal villi and stress resistance rate comparing to other treatments. The results of this study indicate that prebiotic, probiotic and symbiotic supplementation has a positive effect on survival, intestinal morphology and resistance to stress in larvae of *T. leeri*, however, only symbiotic supplementation results in improved growth.

Keywords: *Bacillus subtilis*, food transition, mannan oligosaccharide, ornamental fish

INTRODUÇÃO

O *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae), pertencente à subordem *Anabantoidei*, é conhecido no Brasil como tricogáster ou léri e, internacionalmente, como *Gourami*. Esse peixe é originário do sudeste da Ásia, produzido em inúmeros países, e apresenta elevado retorno econômico aos produtores (Zuanon et al., 2004).

A larvicultura é uma das etapas de produção mais importantes da aquicultura para fornecer animais com qualidade e em larga escala, porém apresenta muitos entraves, destacando-se, dentre eles, a alimentação inicial. A utilização do alimento vivo durante a larvicultura tem sido de extrema importância, pois influencia diretamente a sobrevivência e o crescimento das larvas (Fosse et al., 2013). Apesar disso, o uso de alimento vivo em larvicultura intensiva representa grande parte dos custos de produção (Jomori et al., 2005).

Nesse contexto, ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de estratégias para redução ou substituição do fornecimento do alimento vivo, redução essa que pode ser realizada abruptamente, substituindo totalmente o alimento vivo pelo inerte (ração), ou de forma gradual, iniciando com um período de alimentação conjunta (coalimentação), reduzindo o alimento vivo e aumentando gradualmente o fornecimento de ração, até o fornecimento exclusivo de ração. Entretanto, grande parte das larvas recém-eclodidas utilizadas na piscicultura comercial apresenta sistema digestório rudimentar, com estômago não funcional e baixa atividade de enzimas digestivas, dificultando a utilização de alimentos mais complexos, como microdietas (Kolkovski, 2001). Em razão desses aspectos morfológicos, mesmo com a utilização de protocolos de substituição do alimento vivo pelo inerte, não se conseguem resultados mais expressivos com períodos curtos de transição alimentar. Apesar da importância do *T. leeri* para

a piscicultura ornamental, não existem informações sobre o período de transição alimentar para essa espécie.

Na larvicultura intensiva, as condições estressantes de cultivo podem resultar na redução da resposta imune e consequente queda na resistência, favorecendo, assim, o surgimento de doenças e até elevada mortalidade, que causam consideráveis perdas econômicas e prejudicam o desenvolvimento sustentável da indústria. Os antibióticos foram usados em larga escala como estratégias de prevenção e tratamento de doenças na piscicultura e, em subdosagens, como promotores de crescimento. No entanto, a utilização de antibióticos pode resultar na seleção de bactérias resistentes, na presença de resíduos de antibióticos na carne, bem como na destruição da população microbiana no ambiente aquático de cultivo (Gómez et al., 2007).

Várias estratégias alternativas ao uso de antibióticos têm sido propostas. Uma delas e que tem gerado grande interesse por parte de pesquisadores é a introdução de prebióticos e probióticos em rações. Os prebióticos são compostos não digeríveis por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal, presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela por meio de fontes exógenas concentradas (Gibson e Roberfroid, 1995). Probióticos são microrganismos vivos, que, quando administrados em quantidades apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota no intestino (Verschuere et al., 2000). Os simbióticos são a mistura de prebióticos e probióticos que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhoria da taxa de sobrevivência e da modulação da comunidade microbiana no trato gastrointestinal, estimulando seletivamente o crescimento ou ativando o metabolismo de uma bactéria benéfica (ácido-láctica) ou de limitado número delas e, assim,

melhorando o bem-estar do hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995).

Alguns estudos têm demonstrado os efeitos benéficos dos prebióticos e dos probióticos para peixes, como melhora na utilização do alimento, modulação da microflora intestinal, aumento da resposta imune e antagonismo a patógenos, o que gera maior sobrevivência dos peixes (Verschuere *et al.*, 2000; Ringo *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2015). Contudo, apesar do sucesso obtido pela suplementação isolada de prebióticos e probióticos, poucos estudos avaliaram sua suplementação conjunta na piscicultura, em especial na larvicultura de espécies ornamentais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico em rações para larvas de *T. leeri*, durante a transição alimentar, sobre o crescimento, a sobrevivência, a morfometria intestinal e a resistência ao estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de *T. leeri* utilizadas neste estudo foram provenientes de desova natural de um casal de reprodutores no Laboratório de Bioensaios em Aquicultura Intensiva da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ, onde foi realizado o experimento durante 28 dias.

Foram utilizadas 420 larvas, com peso inicial de $0,45 \pm 0,05$ mg e comprimento total inicial de $3,84 \pm 0,27$ mm, em um delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições cada, a saber: 12 dias de alimento vivo (AV) + oito dias de coalimentação (AV + ração controle) + oito dias de ração controle (AV₁₂CA₈RCO₈); 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração prebiótico) + oito dias de ração prebiótico (AV₁₂CA₈RPE₈); 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração probiótico) + oito dias de ração probiótico (AV₁₂CA₈RPO₈); 12 dias de AV + oito dias de coalimentação (AV + ração simbiótico) + oito dias de ração simbiótico (AV₁₂CA₈RSI₈); 28 dias de AV (AV₂₈).

As larvas foram aleatoriamente distribuídas em 20 aquários, com volume útil de 3,5L (seis larvas/L), os quais possuíam aeração individual por meio de compressor e pedra porosa. Para

manter a temperatura da água nos valores adequados, foram utilizados aquecedores de ambiente, e o fotoperíodo foi mantido em 12 horas.

Como prebiótico, foi utilizado um mananoligossacarídeo oriundo da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex Hansen, 1883, Saccharomycetales, Saccharomycetaceae). Como microrganismo probiótico, foi utilizado o *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872, Bacillales, Bacillaceae) (1×10^{10} unidades formadoras de colônias do probiótico por grama). O simbiótico foi formado pela mistura do prebiótico e do probiótico acima mencionados.

Como alimento vivo, foram utilizados náuplios de artêmia (*Artemia franciscana*, Kellogg, 1906, Anostraca, Artemiidae) recém-eclodidos, utilizando-se para a eclosão, em dois litros de água (30g/L de salinidade), um grama de cisto de artêmia sob aeração.

Para a incorporação do prebiótico, do probiótico e do simbiótico, estes foram diluídos em água e aspergidos sobre as rações. Após a homogeneização, as rações foram levadas à estufa de ventilação forçada a 50°C por 24 horas e, após esse período, foram identificadas e armazenadas em recipientes plásticos mantidos refrigerados até o início do experimento. As rações suplementadas com o probiótico foram avaliadas microbiologicamente para se averiguar a viabilidade dos microrganismos (*B. subtilis*). Os níveis de suplementação do prebiótico e do probiótico, bem como a composição proximal das rações experimentais, estão apresentados na Tab. 1.

Foi adotada frequência alimentar, tanto para o alimento vivo quanto para a ração, de quatro vezes ao dia, sempre às oito, 11, 13 e 17 horas. Em relação ao manejo com o alimento vivo, para as larvas que foram submetidas à coalimentação, a quantidade de náuplios fornecida foi de 75 náuplios/larva/dia, do primeiro ao 12º dia experimental, aumentando-se para 150 náuplios/larva/dia até o 20º dia experimental. Para as larvas que receberam somente artêmia, a quantidade de náuplios fornecida inicialmente foi de 75 náuplios/larva/dia, elevando-se essa quantidade nos dias 13 e 20 para, respectivamente, 150 e 300 náuplios/larva/dia.

Tabela 1. Nível de suplementação de prebiótico e probiótico e composição proximal das rações experimentais

	Controle	Prebiótico	Probiótico	Simbiótico
Suplementos				
Mananligossacarídeo (g/kg)	0	2	0	2
<i>Bacillus subtilis</i> (g/kg)	0	0	2	2
<i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g) ¹	ND ²	ND ²	1,22x10 ⁸	1,47x10 ⁸
Composição proximal				
Matéria seca (g/kg) ³	864,2	866,1	859,5	861,7
Proteína bruta (g/kg) ³	418,9	421,5	414,3	419,8
Extrato etéreo (g/kg) ³	46,68	45,85	45,98	46,12
Energia bruta (kcal/kg) ⁴	3948	3913	4021	4006
Matéria mineral (g/kg) ³	127,8	130,3	136,7	140,1

¹Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de ração; valor obtido segundo Leuschner *et al.* (2003).

²Não detectado.

³Valor analisado segundo Silva e Queiroz (2006).

⁴Valor analisado por meio de bomba calorimétrica (1341 Parr Instrument Company, IL, USA).

Durante o período de coalimentação, foi fornecida primeiramente a ração e, posteriormente, após dois minutos, o alimento vivo. A quantidade diária de ração ofertada para os tratamentos foi à vontade.

As unidades experimentais foram sifonadas diariamente às nove horas, renovando-se dois terços do volume total de água para retirada das fezes, dos restos de alimentos e das larvas mortas. A mortalidade foi registrada antes de cada alimentação e durante a limpeza das unidades experimentais.

Temperatura, oxigênio dissolvido (YSI 550A, YSI Corporation, MA, USA) e pH (mPA 210, MS TECNOPON, Piracicaba, SP) foram mensurados diariamente, enquanto a amônia (HI83203, Hanna Instruments Inc., Rhode Island, USA) foi mensurada semanalmente. Durante o período experimental, os valores de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L), pH e amônia total (mg/L) foram de, respectivamente, 27,63±1,27; 5,51±0,59; 7,09±0,16 e 0,03±0,01.

Ao final do experimento, as larvas foram submetidas ao período de jejum de 12 horas para posteriores avaliações. Para se avaliar o desempenho zootécnico, foi realizada biometria

inicial em 20 larvas e, ao final do período experimental, em todas as larvas sobreviventes. Nessas larvas foram mensurados comprimento total e peso úmido. Com base nos dados biométricos, foram calculadas a taxa de crescimento específico em peso [(ln peso final – ln peso inicial) / período experimental x 100], a taxa de crescimento específico em comprimento [(ln comprimento final – ln comprimento inicial) / período experimental x 100] e a sobrevivência [(número final de larvas / número inicial de larvas) x 100].

Seis larvas por tratamento foram retiradas para análise de morfometria intestinal. Essas larvas foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e transferidas para álcool 70% até o processamento. O material foi processado com técnica de rotina para histologia. Os cortes transversais, com cinco micrômetros de espessura, semisseriados, foram corados pela técnica para coloração com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas histológicas foram analisadas utilizando-se microscópio óptico (E200, Nikon, Tóquio, Japão) e analisador de imagens (Infinity Analyze®), por meio dos quais se avaliaram os parâmetros altura, largura e espessura do epitélio das vilosidades intestinais (Fig.1).

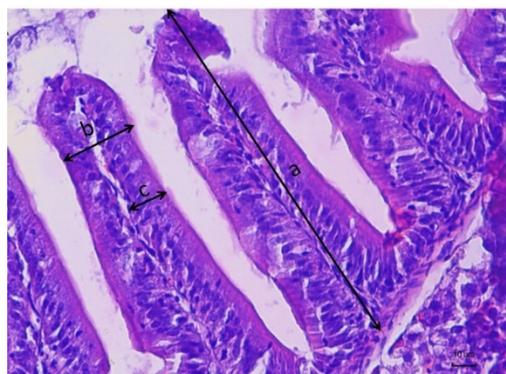


Figura 1. Morfologia intestinal de larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). a – altura das vilosidades; b – largura das vilosidades; c – espessura do epitélio das vilosidades. HE, obj. 100x.

Para se avaliar a resistência ao estresse, ao final do experimento, as larvas foram submetidas a diferentes tempos de exposição ao ar. Para isso, três larvas de cada repetição foram capturadas com peneira de malha 0,5mm e imediatamente dispostas sobre papel absorvente e expostas ao ar (temperatura ambiente 30°C e umidade relativa

60%) durante 1,5; 4,5 e 13,5 minutos. Após o término do período de exposição ao ar, as larvas, para cada tempo de exposição, foram alocadas em recipientes plásticos individuais, dentro das unidades experimentais, e observadas durante 24 horas. A sobrevivência foi determinada, e considerada a taxa de resistência ao estresse (Luz *et al.*, 2012).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade, e, havendo diferenças significativas, aplicou-se o teste de Tukey. Os dados expressos em porcentagem foram transformados de acordo com a fórmula $y = \arccos(\sqrt{x})$, para posterior avaliação. Para as análises, utilizou-se o programa estatístico *Statistical Analysis System 9.0*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo da estratégia de alimentação sobre os parâmetros de crescimento e sobrevivência avaliados (Tab. 2).

Tabela 2. Crescimento e sobrevivência das larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae) de acordo com o tratamento¹

Tratamento	Variável ²				
	PF (mg)	CF (mm)	TCE _p (%/dia)	TCE _c (%/dia)	SOB (%)
AV ₁₂ CA ₈ RCO ₈	14,30±1,76C	10,97±0,81C	12,34±0,43C	3,75±0,27B	46,03±5,41C
AV ₁₂ CA ₈ RPE ₈	13,41±1,44C	11,61±0,63C	12,11±0,40C	3,95±0,19B	57,15±6,23B
AV ₁₂ CA ₈ RPO ₈	16,26±1,33C	12,08±0,57C	12,81±0,29BC	4,09±0,17B	61,32±1,38AB
AV ₁₂ CA ₈ RSI ₈	23,79±3,54B	16,51±1,27B	14,13±0,57B	5,20±0,28A	66,67±7,20A
AV ₂₈	46,61±14,55A	19,84±1,44A	16,46±1,11A	5,86±0,26A	71,43±10,00A
Valor de P	0,007	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Valor de F	12,18	37,65	22,66	38,62	56,63

¹Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. ²PF, peso final; CF, comprimento final; TCE_p, taxa de crescimento específico em peso; TCE_c, taxa de crescimento específico em comprimento; SOB, sobrevivência.

Larvas submetidas ao tratamento com alimento vivo durante todo o período experimental apresentaram crescimento significativamente superior aos animais dos demais tratamentos, com exceção da taxa de crescimento específico em comprimento, parâmetro em que apresentaram resultados similares às larvas que passaram pela transição alimentar com ração suplementada com simbiótico. Resultados semelhantes aos obtidos no presente experimento foram observados em larvas de *Betta splendens*

(Regan, 1910, Perciformes, Osphronemidae) (Fosse *et al.*, 2013) e *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823, Perciformes, Cichlidae) (Pereira *et al.*, 2016).

As larvas altriciais apresentam pequena reserva de vitelo e não possuem sistema digestório completamente desenvolvido e funcional no início da alimentação exógena, o que as torna dependentes do alimento vivo na sua alimentação inicial (Kolkovski, 2001). Além disso, o

insucesso na alimentação de larvas de peixes com alimentação inerte pode ser decorrente de fatores que variam desde a falta de estímulo visual até fatores intrínsecos à própria ração, como textura, cor, sabor, tamanho, os quais podem afetar a aceitabilidade e a digestibilidade de nutrientes (Onal e Langdon, 2000). Esses fatores em conjunto podem explicar o maior crescimento das larvas alimentadas com alimento vivo durante todo o período experimental em comparação aos demais tratamentos.

Ao se analisarem apenas os resultados obtidos com larvas que passaram pela transição alimentar, resultados significativamente superiores foram observados para larvas que receberam ração suplementada com simbiótico para os parâmetros peso final, comprimento final e taxa de crescimento específico em comprimento, em relação às larvas que receberam as rações controle, prebiótico e probiótico, e entre estas não houve diferença significativa. Para a taxa de crescimento específico em peso, larvas que receberam a ração suplementada com simbiótico apresentaram resultados significativamente superiores às larvas alimentadas com as rações controle e prebiótico, não diferindo das larvas alimentadas com a ração acrescida de probiótico.

Corroborando os resultados do presente estudo, Dimitroglou *et al.* (2010), com larvas de *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758, Perciformes, Sparidae), e Schwarz *et al.* (2011), com larvas de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758, Perciformes, Cichlidae), não observaram efeito da suplementação com prebiótico sobre o crescimento. De igual modo, a ausência de efeito da suplementação com probióticos sobre o crescimento de peixes já foi relatada por outros autores, como Souza *et al.* (2012) para larvas de *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824, Siluriformes, Pimelodidae) e Hernandez *et al.* (2010) para *Poeciliopsis gracilis* (Heckel, 1848, Cyprinodontiformes, Poeciliidae). Por outro lado, a melhora no crescimento com a utilização de probióticos foi relatada em larvas de *Brycon amazonicus* (Spix e Agassiz, 1829, Characiformes, Bryconidae) (Dias *et al.*, 2011) e larvas de *P. scalare* (Farahi *et al.*, 2011).

Cerezuela *et al.* (2011) definiram simbiótico como a combinação de prebiótico e probiótico, de modo que ocorra sinergismo entre ambos,

aumentando seus efeitos benéficos isolados, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Probióticos podem agir melhorando a eficiência alimentar ao produzirem vitaminas e enzimas digestivas exógenas. Aumento na produção de amilase, lipase e protease foi observado em tilápias que receberam rações contendo *B. subtilis* (Essa *et al.*, 2010). Os prebióticos podem atuar estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos produtos do metabolismo atuam na redução do pH, além de reduzirem os sítios de adesão, diminuindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995). Aumento da disponibilidade de nutrientes para absorção no trato gastrointestinal, aumento do *pool* de enzimas digestivas e uso do suplemento bacteriano como fonte adicional de nutriente podem explicar a melhora no desempenho de larvas alimentadas com simbiótico.

Quanto à sobrevivência, tanto as larvas alimentadas exclusivamente com artêmia quanto as que receberam ração suplementada com simbiótico apresentaram resultados significativamente superiores, não diferindo das larvas que receberam ração suplementada com probiótico. Os piores resultados foram obtidos por larvas que receberam a ração controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por Torrecillas *et al.* (2007) para *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758, Perciformes, Moronidae), que recebeu ração suplementada com prebiótico, e Staykov *et al.* (2007) para *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792, Salmoniformes, Salmonidae), que recebeu ração suplementada com probiótico. No entanto, para outras espécies de peixes, não houve melhora na sobrevivência, como para *P. scalare* (Farahi *et al.*, 2011) e *P. gracilis* (Hernandez *et al.*, 2010), que receberam rações suplementadas com probióticos, e *D. sargus*, que recebeu ração suplementada com prebiótico (Dimitroglou *et al.*, 2010).

Um dos benefícios mais comuns da suplementação com prebióticos e probióticos é o seu efeito sobre a saúde dos animais. Diferentes respostas podem ser dependentes da dose, do tipo e da duração da sua administração (Ringo *et al.*, 2010). Alguns estudos em aquicultura têm demonstrado a capacidade dos prebióticos e dos

probióticos em aumentar as repostas imunes inata e adaptativa no tecido linfoide associado ao intestino, bem como a imunidade sistêmica, como atividade fagocítica, atividade da lisozima e expressão de algumas citocinas e anticorpos, e consequentemente a resistência a doenças e à

sobrevivência (Ai *et al.*, 2011; Safari *et al.*, 2014).

A estratégia de alimentação influenciou significativamente a altura das vilosidades e não alterou os parâmetros largura das vilosidades e espessura do epitélio das vilosidades (Tab. 3).

Tabela 3. Morfometria intestinal de larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae) de acordo com a alimentação¹

Tratamento	Variável		
	Altura das vilosidades (µm)	Largura das vilosidades (µm)	Espessura do epitélio das vilosidades (µm)
AV ₁₂ CA ₈ RCO ₈	107,75±20,42B	32,55±5,39A	12,39±1,75A
AV ₁₂ CA ₈ RPE ₈	139,43±15,14A	36,05±5,49A	14,06±2,39A
AV ₁₂ CA ₈ RPO ₈	145,99±9,50A	37,40±4,17A	13,68±2,73A
AV ₁₂ CA ₈ RSI ₈	148,74±25,02A	39,54±9,20A	13,87±1,59A
AV ₂₈	156,85±10,14A	37,64±4,47A	14,17±1,25A
Valor de P	0,0001	0,2685	0,9327
Valor de F	27,24	1,52	0,20

¹Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Larvas alimentadas com alimento vivo durante todo o período experimental e larvas que receberam rações suplementadas com prebiótico, probiótico e simbiótico apresentaram valores significativamente superiores para altura das vilosidades comparadas às larvas que receberam a ração controle.

Dimitroglou *et al.* (2010), com larvas de *D. sargus*, e Schwarz *et al.* (2011), com larvas de *O. niloticus*, avaliaram a suplementação com mananoligossacarídeo nas rações e observaram aumento na altura das vilosidades intestinais quando estas foram comparadas ao grupo controle. Mello *et al.* (2013) observaram maiores valores de altura e largura das vilosidades e da espessura do epitélio das vilosidades de *O. niloticus* alimentados com ração contendo probiótico quando comparados aos peixes que não receberam suplementação.

Prebióticos podem agir estimulando seletivamente o crescimento de bactérias benéficas, servindo como substrato para fermentação (Ringo *et al.*, 2010). Nesse sentido, com o equilíbrio da microbiota intestinal, a mucosa intestinal pode apresentar melhores condições de desenvolvimento, resultando em maior integridade e tamanho das vilosidades. O probiótico pode ter reduzido a colonização de

bactérias prejudiciais, uma vez que pode atuar inibindo sua aderência ao enterócito por meio da ligação com o glicocalix. Algumas bactérias probióticas podem se aderir ao muco e à mucosa intestinal de peixes durante a suplementação (Verschuere *et al.*, 2000). Assim, a bactéria probiótica utilizada pode ter sido incorporada à microbiota intestinal, competindo com bactérias prejudiciais à mucosa, resultando na influência sobre o aumento da altura das vilosidades. Segundo Verschuere *et al.* (2000), a microbiota intestinal influencia o desenvolvimento, a diferenciação e a integridade intestinal, o que pode explicar o aumento na altura das vilosidades intestinais em larvas que receberam probiótico por meio da dieta.

A capacidade de absorção intestinal está relacionada com a superfície disponível, a qual é dependente do tamanho e do número das vilosidades (Silva *et al.*, 2010). O maior valor na altura das vilosidades apresentado pelas larvas que receberam suplementação na dieta ou somente alimento vivo sugere melhor integridade da mucosa intestinal, permitindo seu melhor desenvolvimento e, consequentemente, maior eficiência no processo absorptivo. No entanto, neste estudo, os maiores valores para altura de vilosidades intestinais não deram suporte à hipótese de melhor utilização e absorção de

nutrientes em larvas que receberam apenas prebiótico ou probiótico.

A taxa de resistência ao estresse, em todos os tratamentos, foi de 100% para o tempo de 1,5 minuto de exposição ao ar (Fig.2).

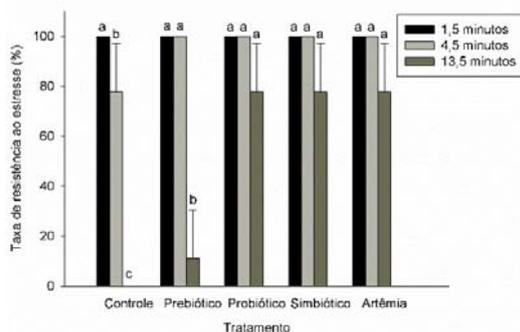


Figura 2. Taxa de resistência ao estresse de larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae) submetidas a diferentes tempos de exposição ao ar. Barras de cores semelhantes, sobrescritas com letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No tempo de exposição ao ar de 4,5 minutos observou-se que larvas alimentadas com a ração controle apresentaram menor ($P=0,0343$; $F=4,00$) taxa de resistência ao estresse (77,78%) em relação aos demais tratamentos (100%). Os melhores resultados para o tempo de exposição ao ar de 13,5 minutos foram obtidos por larvas alimentadas exclusivamente com artêmia e por larvas alimentadas com rações suplementadas com simbiótico e probiótico, obtendo-se valores de 77,78%. Esses resultados foram superiores ($P=0,0002$; $F=16,00$) aos obtidos por larvas alimentadas com ração suplementada com prebiótico (11,11%) e por larvas alimentadas com a ração controle, as quais apresentaram os piores resultados (0,00%).

A maior resistência ao estresse por exposição ao ar pode indicar, indiretamente, melhora na resposta imunológica. De fato, foi demonstrado que existe forte correlação positiva entre a resistência ao estresse e o aumento nos parâmetros da resposta imune na aquicultura (Safari et al., 2014). De modo semelhante ao presente estudo, Safari et al. (2014), com *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823, Decapoda, Astacidae), e Hernandez et al. (2010), com *P. gracilis*, observaram que a suplementação

de, respectivamente, prebiótico e probiótico aumentou a resistência ao estresse por exposição ao ar. Os resultados são relacionados pelos autores à melhora na condição de saúde dos peixes, embora os mecanismos específicos não estejam evidenciados.

Dentre os fatores estressantes na piscicultura, destacam-se os manejos que podem ocorrer ao final da larvicultura, que incluem o transporte e a transferência para outros tanques (Luz et al., 2012). Nesse sentido, segundo Koven et al. (2001), a alimentação correta pode elevar as taxas de sobrevivência dos peixes após a transferência, reduzindo os efeitos do estresse causado por esse manejo, o que pode ser confirmado no presente experimento, no qual a suplementação com prebiótico e simbiótico, além da alimentação tradicional (artêmia), aumentou a taxa de resistência ao estresse quando se compararam esses animais àqueles alimentados com a ração controle.

A larvicultura intensiva caracteriza-se pelo aumento nos custos de produção devido a despesas relacionadas com a produção do alimento vivo e a mão de obra comparada a sistemas menos intensivos (Jomori et al., 2005). Assim, o custo de produção de larvas de peixes em regime intensivo aumenta proporcionalmente ao tempo de oferta de alimento vivo, tornando-se importante o desenvolvimento de estratégias que permitam suprimir o alimento vivo de forma precoce. Além disso, o sucesso na transição alimentar é determinado pelo tempo de coalimentação, pela composição nutricional, palatabilidade e digestibilidade da ração (Faulk et al., 2007).

Não existem informações sobre o tempo de transição alimentar na larvicultura do *T. leeri* e, no presente estudo, o tempo de coalimentação utilizado foi baseado nos resultados obtidos com *B. splendens* (Fosse et al., 2013). Baseando-se nos resultados obtidos para taxa de crescimento específico em comprimento e considerando-se que a sobrevivência é um dos fatores mais importantes durante a larvicultura de peixes, o período de 12 dias de alimento vivo e oito dias de coalimentação é suficiente para transição alimentar do *T. leeri*, desde que a ração seja suplementada com simbiótico.

CONCLUSÕES

O período de 12 dias de alimento vivo e oito dias de coalimentação é suficiente para transição alimentar de larvas de *T. leeri* desde que a ração seja suplementada com simbiótico. A suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico exerce efeito positivo sobre a sobrevivência, a morfometria intestinal e a resistência ao estresse em larvas de *T. leeri*, no entanto somente a suplementação com simbiótico resulta em melhora no crescimento.

REFERÊNCIAS

- AI, Q.; XU, H.; MAI, K. *et al.* Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, v.317, p.155-161, 2011.
- AZEVEDO, R.V.; FOSSE-FILHO, J.C.; CARDOSO, L.D. *et al.* Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Rev. Ciênc. Agron.*, v.46, p.72-79, 2015.
- CEREZUELA, R.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *J. Aquacult. Res. Dev.*, S1:008, 2011.
- DIAS, D.C.; CORREA, C.F.; LEONARDO, A.F.G. *et al.* Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.33, p.365-368, 2011.
- DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S.J.; SWEETMAN, J. *et al.* Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquac. Res.*, v.41, p.245-251, 2010.
- ESSA, M.A.; EL-SERAFY, S.S.; EL-EZABI, M.M. *et al.* Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Arabian Aquacult. Soc.*, v.5, p.143-161, 2010.
- FARAH, A.; KASIRI, M.; SUDAGAR, M.; ALAMSHAHI, F. The effects on growth, survival and tolerance against environmental stressor (high temperature) of different concentrations probiotic *Bacillus* sp., fed to algelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823) larvae. *J. Anim. Vet. Adv.*, v.10, p.2305-2311, 2011.
- FAULK, C.K.; KAISER, J.; HOLT, G.J. Growth and survival of larval and juvenile cobia *Rachycentron canadum* in a recirculating raceway system. *Aquaculture*, v.270, p.149-157, 2007.
- FOSSE, P.J.; MATTOS, D.C.; CARDOSO, L.D. *et al.* Estratégia de coalimentação na sobrevivência e no crescimento de larvas de *Betta splendens* durante a transição alimentar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p.1801-1807, 2013.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, v.125, p.401-412, 1995.
- GÓMEZ, R.; GEOVANNY, D.; BALCÁZAR, J.L.; SHEN, M.A. Probiotic as control agents in Aquaculture. *J. Ocean Univ. China*, v.6, p.76-79, 2007.
- HERNANDEZ, L.H.H.; BARRERA, T.C.; MEJIA, J.C. *et al.* Effects of commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae). *Aquacult. Nutr.*, v.16, p.407-411, 2010.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; GERALDO-MARTINS, M.I.E.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture*, v.243, p.175-183, 2005.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, v.200, p.181-201, 2001.
- KOVEN, W.; BARR, Y.; LUTSKY, S. *et al.* The effect of dietary arachidonic acid (20:4n – 6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, v.193, p.107-122, 2001.

- LEUSCHNER, R.G.; BEW, J.; CRUZ, A. *et al.* Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, v.86, p.568-575, 2003.
- LUZ, R.K.; RIBEIRO, P.A.R.; IKEDA, A.L. *et al.* Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude protein levels. *Rev. Bras. Zootec.*, v.41, p.457-461, 2012.
- MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G. *et al.* Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.724-730, 2013.
- ONAL, U.; LANGDON, C. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquacult. Nutr.*, v.6, p.159-170, 2000.
- PEREIRA, S.L.; GONÇALVES-JÚNIOR, L.P.; AZEVEDO, R.V. *et al.* Diferentes estratégias alimentares na larvicultura do acará-bandeira (*Peterolophyllum scalare*, Cichlidae). *Acta Amaz.*, v.46, p.91-98, 2016.
- RINGO, E.; OLSEN, R.; GIFSTAD, T. *et al.* Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquacult. Nutr.*, v.16, p.117-136, 2010.
- SAFARI, O.; SHAHSAVANI, D.; PAOLUCCI, M. *et al.* Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements on the growth performance, nutrient digestibility, immune responses and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz, 1823. *Aquaculture*, v.432, p.192-203, 2014.
- SCHWARZ, K.K.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M. *et al.* Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Revleusch. Bras. Zootec.*, v.40, p.2634-2640, 2011.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: UFV, 2006. 235p.
- SILVA, L.C.R.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M. *et al.* Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *R. Bras. Zootec.*, v.39, p.1175-1179, 2010.
- SOUZA, D.M.; MARTINS, G.B.; PIEDRAS, S.R.N. *et al.* Probiotic actions of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* in silver catfish (*Rhamdia quelen*) larvae culture. *R. Bras. Zootec.*, v.41, p.815-819, 2012.
- STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, v.15, p.153-161, 2007.
- TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J. *et al.* Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immun.*, v.23, p.969-981, 2007.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, v.64, p.655-671, 2000.
- ZUANON, J.A.S.; ASSANO, M.; FERNANDES, J.B.K. Desempenho de tricogaster (*Trichogaster trichopterus*) submetido a diferentes níveis de arraçoamento e densidades de estocagem. *R. Bras. Zootec.*, v.33, p.1639-1645, 2004.