

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM PROBIÓTICO E BUTIRATO DE SÓDIO NO PRÉ-BERÇÁRIO DE *Litopenaeus vannamei*

Marcello Mendes dos SANTOS-JUNIOR¹; Efrayn Wilker Souza CANDIA¹; Gabriel Fernandes Alves de JESUS¹; Walter Quadros SEIFFERT¹; José Luiz Pedreira MOURIÑO¹; Felipe do Nascimento VIEIRA¹

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o uso suplementar de probiótico (*Lactobacillus plantarum*) e butirato de sódio, e a interação deles na dieta de pós-larvas de camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) em fase de pré-berçário. Durante o experimento foram aplicados nas dietas os tratamentos: (1) probiótico 1x10⁸ UFC/g, (2) butirato de sódio 2%, (3) probiótico 1x10⁸ UFC/g + butirato de sódio 2%, (4) controle (dieta base). Todos os tratamentos tiveram a adição de meio de cultura na mesma dosagem utilizada nos tratamentos com probiótico. Foram utilizadas 16 unidades experimentais de 60 L cada uma, com fundo em formato U, povoadas com 2.880 pós-larvas 5. Após quinze dias, independentemente da presença ou não do probiótico, os camarões dos tratamentos com butirato apresentaram maior sobrevivência (p = 0,0039) e menor peso seco individual (p = 0,0043). Não foram observadas alterações morfológicas no intestino das pós-larvas em nenhum dos tratamentos. Portanto, a suplementação com butirato de sódio na ração aumenta a sobrevivência das pós-larvas de camarões na fase de pré-berçário sem causar alteração morfológica em seu intestino.

Palavras-chave: camarão; cultivo; *Lactobacillus plantarum*; sal orgânico; pós-larva; vibriose

DIETARY SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTIC AND BUTYRATE FOR *Litopenaeus vannamei* IN PRE-NURSERY

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the diet supplementation with sodium butyrate, probiotic (*Lactobacillus plantarum*) and their interaction, in the diet for post-larvae of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in pre-nursery. We used the following treatments during the entire experimental period: (1) Probiotic 1x10⁸ UFC/g, sodium butyrate 2%, (3) probiotic 1x10⁸ UFC/g + sodium butyrate 2%, (4) control (Base diet). In all treatment we added culture medium in the same doses as in the probiotic treatments. We used 16 experimental units of 60L each, with the bottom U-shaped, stocked with 2,880 post-larvae 5. Fifteen days later, regardless the presence or absence of the probiotic, shrimps from treatment with butyrate had higher survival (p = 0.0039) and lowest individual dry weight (p = 0.0043). No morphological changes were observed in the gut of post-larvae in any treatment. Therefore, the diet supplementation with sodium butyrate increases the survival of shrimp post-larvae of in the pre-nursery phase, without causing morphological changes in its gut.

Keywords: shrimp; culture; *Lactobacillus plantarum*; organics salt; post-larvae; vibriosis

Artigo Científico: Recebido em 03/12/2015 – Aprovado em 19/04/2016

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas número 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil. felipe.vieira@ufsc.br

INTRODUÇÃO

Para a expansão do cultivo de camarões é necessário conhecer o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva, desde a maturação e larvicultura até as fases finais de engorda. Em regiões mais frias, como o sul do Brasil, existe a necessidade de adaptação de alguns manejos de produção. Uma destas adaptações é a utilização de uma fase intermediária entre larvicultura (náuplio a pós-larva 5 ou 10) e berçário (pós-larva 20 a ± 1 g). Esta fase, denominada pré-berçário, compreende um período de 10 a 15 dias, necessário para que as formas jovens atinjam a melhor capacidade de adaptação ao viveiro escavado (ANDREATTA e BELTRAME, 2004).

Na fase de pré-berçário é importante manter a turbidez da água através da inserção de microalgas, pois as pós-larvas são fotossensíveis. Ainda que, com menor frequência que na larvicultura, no pré-berçário há renovações periódicas da água para que ocorra diluição dos compostos nitrogenados e da matéria orgânica acumulada, que podem desestabilizar o sistema e sensibilizar as pós-larvas (PRABHU *et al.*, 1999). Com a sensibilização das larvas e pós-larvas podem ocorrer doenças, na maioria das vezes de origem bacteriana. Os vibriões são uns dos principais patógenos causadores de mortalidade na fase de pré-berçário.

Com a proposta de aumentar a produtividade de camarões, pesquisadores têm procurado encontrar métodos, principalmente profiláticos, para: diminuir a mortalidade por doenças, aumentar a sanidade, diminuir o consumo de água e produção de efluentes e, ainda, melhorar a digestibilidade e conversão alimentar dos animais (ENCARNAÇÃO, 2010; LIM *et al.*, 2010; BARBIERI *et al.*, 2016). Dentre estas novas tecnologias inclui-se a utilização de imunostimulantes, probióticos, fitoterápicos e ácidos orgânicos (MINE e BOOPATHY, 2011).

O uso de probiótico já é bastante difundido em todos os ramos da produção animal, inclusive em aquicultura. Na larvicultura de camarão marinho, o uso do probiótico *Lactobacillus plantarum* tem sido promissor. Em estudo desenvolvido por VIEIRA *et al.* (2007), larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas com dietas suplementadas com a bactéria probiótica

apresentaram maior índice de sobrevivência, maior atividade natatória e menor ocorrência de necrose durante a larvicultura.

Os ácidos orgânicos e seus sais, além da ativa inibição do crescimento dos micro-organismos, principalmente de bactérias Gram-negativas (DEFOIRDT *et al.*, 2009), podem ter efeitos sobre o metabolismo. Estes compostos influem na produção e ação de enzimas digestivas (LÜCKSTÄDT, 2008) e melhoram a absorção de minerais pelo intestino (HOSSAIN *et al.*, 2007).

Entre os sais orgânicos, destaca-se o butirato de sódio [$\text{Na}(\text{C}_3\text{H}_7\text{COO})$], que possui cadeia de quatro carbonos e é derivado do ácido butírico, um ácido orgânico fraco. Já foi demonstrado que o butirato de sódio tem atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas patogênicas do gênero *Vibrio*, aumenta a atratividade da dieta e diminui a quantidade de *Vibrio* sp. no trato intestinal de camarões (*L. vannamei*) alimentados com dieta suplementada com este sal (SILVA *et al.*, 2013). Adicionalmente, a suplementação da dieta com 5% de butirato de sódio melhorou a conversão alimentar, retenção de nitrogênio e fósforo, sobrevivência e produtividade de camarões (*L. vannamei*) cultivados em sistema de água clara (SILVA *et al.*, 2016). Contudo, o uso de butirato de sódio na fase de pré-berçário ainda não foi avaliado.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros zootécnicos e identificar a sanidade morfológica do trato intestinal de pós-larvas de camarões (*L. vannamei*) cultivadas em sistema de pré-berçário e alimentadas com ração suplementada com probiótico *Lactobacillus plantarum*, butirato de sódio e a soma de probiótico e butirato de sódio.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na sala de experimentos de larvicultura e pré-berçário do Laboratório de Camarões Marinhos - LCM-UFSC, no período entre 06/11/2013 e 20/11/2013.

Avaliou-se o uso suplementar de probiótico (*Lactobacillus plantarum*) e butirato de sódio, e a interação deles na dieta de pós-larvas de camarão-branco-do-pacífico em fase de pré-berçário. Durante o experimento, foram aplicados

nas dietas os tratamentos: (1) probiótico 1×10^8 UFC/g, (2) butirato de sódio 2%, (3) probiótico 1×10^8 UFC/g + butirato de sódio 2%, (4) controle (dieta base). Todos os tratamentos tiveram a adição de meio de cultura (Man Rogosa e Sharpe, MRS), na mesma dosagem de 10 mL/g de ração utilizada no tratamento com probiótico. Após a aspersão da ração dos tratamentos, a ração foi inserida em um recipiente sob vácuo por 4 a 6 horas. Em seguida, passou pelo processo de fermentação, incubado em estufa a 35 °C por 12 horas e, então, armazenada sob refrigeração em frascos de borossilicato. O procedimento de preparo da ração foi realizado três vezes durante o experimento (um dia antes do início do experimento e nos dias 5 e 9).

Foram utilizadas 16 unidades experimentais com fundo em U e capacidade útil de 60 L, providas de aeração e aquecimento. Cada unidade experimental foi povoada com 2.880 pós-larvas, cinco (pós-larvas de 5 dias), em água previamente adicionada de microalga *Nannochloropsis oculata* na concentração de 10×10^4 cel/mL. As larvas foram alimentadas nove vezes ao dia com ração de acordo com a fase larval [Rações INVE EPAC PL (100-300 μ m; PL 5 a 10), EPAC XL (300-600; PL 11 a 20), com proteína bruta mínima (45%), umidade máxima (10%), fibra bruta máxima (3%), matéria mineral máxima (15%), extrato etéreo mínimo (7%), cálcio máximo (2,2%), cálcio mínimo (1%) e fósforo mínimo (1%)]. As dietas preparadas com os tratamentos foram adicionadas em quantidades pertinentes ao estágio larval: PL5-PL10: 450 mg/milheiro de larva.dia; PL11-14: 540 mg/milheiro de larva.dia; pl15-pl18: 675 mg/milheiro de larva.dia; PL19-20: 765 mg/milheiro de larva.dia.

Os parâmetros oxigênio dissolvido e temperatura da água foram aferidos duas vezes ao dia com oxímetro (YSI, modelo Pro 20), o potencial hidrogeniônico (pH); uma vez ao dia com peagâmetro (YSI, modelo Professional Plus); e a amônia total, medida a cada três dias pelo método colorimétrico de APHA (1995). As renovações de água foram feitas com água marinha, com troca de 50% do volume nos dias 4, 7 e 10 do experimento.

Para a análise microbiológica, três amostras de 1 g de pós-larvas 20 (pesadas em balança analítica BEL-SSR 3000 S) foram retiradas ao final

do experimento, sendo as larvas contadas, lavadas com água destilada, maceradas e semeadas em meio de cultura Ágar Marine (para contagem total de bactérias), Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, para *Vibrio* spp.) e Ágar de MRS (para bactérias ácido-láticas). Depois de serem incubadas a 30 °C, as colônias bacterianas crescidas em 24 h (TCBS e Marine) e 48 h (MRS) foram contadas em unidades formadoras de colônia (UFC) e ajustadas para UFC/g de pós-larvas. Para o teste de viabilidade da bactéria probiótica na ração, utilizou-se 1 g de ração macerada semeada em meio MRS e incubada a 35 °C por 48 horas.

A população final e a sobrevivência em cada unidade experimental foram estimadas por extrapolação do peso final de pós-larvas despescadas, levando em conta a biometria das pós-larvas (ao menos 100 pós-larvas pesadas individualmente) e usando as seguintes equações: população final de pós-larvas = peso total das pós-larvas despescadas (g)/peso médio das pós-larvas; sobrevivência = (população final de pós-larvas/população inicial de pós-larvas) x 100.

Para o peso seco utilizaram-se placas de Petri previamente secas e pesadas, onde se colocaram 100 larvas. Estas larvas foram secas em estufa à temperatura de 100 °C por uma hora e pesadas em balança de precisão BEL-SSR 3000 S.

Para análise histológica, os tecidos (abdômen e região do intestino médio) foram fixados em solução de Davidson marinho por 24-48 h e transferidos para solução de álcool 70%. A cabeça e os últimos segmentos abdominais foram seccionados, sendo o material restante (abdômen) submetido ao procedimento padrão de histologia, a saber: desidratação, diafanização e inclusão em parafina (Vetec), sendo as lâminas cortadas do intestino médio com 5 μ m de espessura (em micrótomo) e coradas com hematoxilina de Harris e Eosina (HOWARD *et al.*, 2004). Avaliou-se a estrutura do parênquima intestinal com objetiva de 100x em óleo de imersão.

Os dados de sobrevivência e mortalidade foram transformados em arco seno e os dados de contagem bacteriana, transformados em Log 10. Os dados foram analisados, após as premissas de normalidade e homocedasticidade, por análise de variância bifatorial, suplementadas pelo teste de

Tukey de separação de médias, ambos no nível de significância de 5%. Todas as análises foram efetuadas com programa computacional Statistica 12.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água mantiveram seus índices dentro dos ideais para a fase e espécie estudada, ou seja, amônia tóxica próximo de zero, temperatura em $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, pH em $8 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido acima de 5 mg/L (BOYD e GAUTIER, 2000).

Embora tenha havido crescimento de bactérias ácido-láticas na ração, com magnitude de $5,94 \times 10^6$ UFC/g (com butirato) e $4,22 \times 10^6$ UFC/g (sem butirato) após dois dias de armazenamento, não houve crescimento de bactérias ácido-láticas na cultura de macerado das pós-larvas 20 em MRS em nenhum dos tratamentos.

As contagens de bactérias totais e presuntivas de vibriões não diferiram entre os tratamentos (Tabela 1). A ausência de crescimento de bactérias ácido-láticas no macerado de larvas tratadas com probiótico pode ser a causa de não se registrarem diferenças no crescimento de vibriões, já que diversos trabalhos indicam a eficácia da suplementação com probiótico para este fim (VIEIRA *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2012; RAMIREZ *et al.*, 2013).

Em *Farfantepenaeus brasiliensis* juvenis de aproximadamente 0,46 g, três probióticos comerciais diferentes proporcionaram menor quantidade de vibriões após administrados por 30 dias em sistema de troca zero de água (SOUZA *et al.*, 2012). RAMIREZ *et al.* (2013) comprovaram que o uso de *L. plantarum* como suplemento na ração administrada por seis semanas a juvenis de *L. vannamei* diminui o teor de vibriões no trato gastrointestinal e aumenta o título aglutinante do soro contra *Vibrio alginolyticus*.

A sobrevivência das larvas foi superior nos grupos alimentados com ração suplementada com butirato de sódio a 2%, porém o peso seco médio foi menor nesse grupo (Tabela 1). Isso pode ser explicado porque, havendo maior densidade, há maior competição pelo alimento, já que as refeições eram ofertadas em quantidade igual em todas as unidades experimentais, não considerando a mortalidade ao longo do cultivo. Este resultado corrobora os obtidos por SILVA *et al.* (2013), que demonstraram que dietas suplementadas com sais orgânicos aumentam a sobrevivência de camarões marinhos na fase de engorda.

Em contrapartida, no presente estudo, o uso do probiótico resultou em sobrevivência de pós-larvas igual à registrada no controle, não concordando com os resultados do estudo feito por ZIAEI-NEJAD *et al.* (2006), no qual a administração de *Bacillus* spp. melhorou a sobrevivência de pós-larvas de *Fenneropenaeus indicus* que receberam o probiótico diretamente na água entre pós-larva 30 e 120. Neste estudo, o resultado pode ser explicado pela ausência de contagem de bactérias probióticas nas larvas dos tratamentos com dieta suplementada com probiótico.

Mediante a análise qualitativa dos cortes histológicos da porção média do trato intestinal das pós-larvas, as estruturas evidenciadas foram semelhantes às encontradas em animais adultos (BELL e LIGHTNER, 1988), não tendo sido observada alteração no epitélio intestinal de nenhum animal analisado (Figura 1). Estudos referentes à estrutura do intestino de pós-larvas de camarões são escassos. Contudo, destaca-se que o uso tanto do probiótico quanto do ácido orgânico não compromete a estrutura intestinal das pós-larvas de camarões; deste modo, são de uso seguro na fase de pré-berçário.

Tabela 1 - Dados zootécnicos e microbiológicos do cultivo em pré-berçário experimental de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas com ração suplementada com butirato de sódio 2% e probiótico *Lactobacillus plantarum* 1×10^8 UFC/g ou a combinação destes (MIX).

	Sobrev.* (%)	Peso seco (mg)	Vibriões (UFC/g)	Bactérias totais (UFC/g)
Controle	73,30±2,14b**	1,52±0,13a	1,01±1,58×10 ⁶	2,38±1,12×10 ⁷
Butirato	89,30±0,70a	1,34±0,2b	6,08±1,96×10 ⁵	3,14±3,21×10 ⁷
Probiótico	65,05±2,75b	1,51±0,16a	8,51±7,28×10 ⁵	3,42±1,44×10 ⁷
MIX	81,03±10,27a	1,37±0,05b	3,05±4,92×10 ⁵	4,38±3,53×10 ⁷
P do probiótico	0,1040	0,4259	0,7826	0,0445
P do butirato	0,0040	0,0043	0,938	0,4112
P da interação	0,8836	0,5153	0,0306	0,2726

*Sobrevivência, **letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

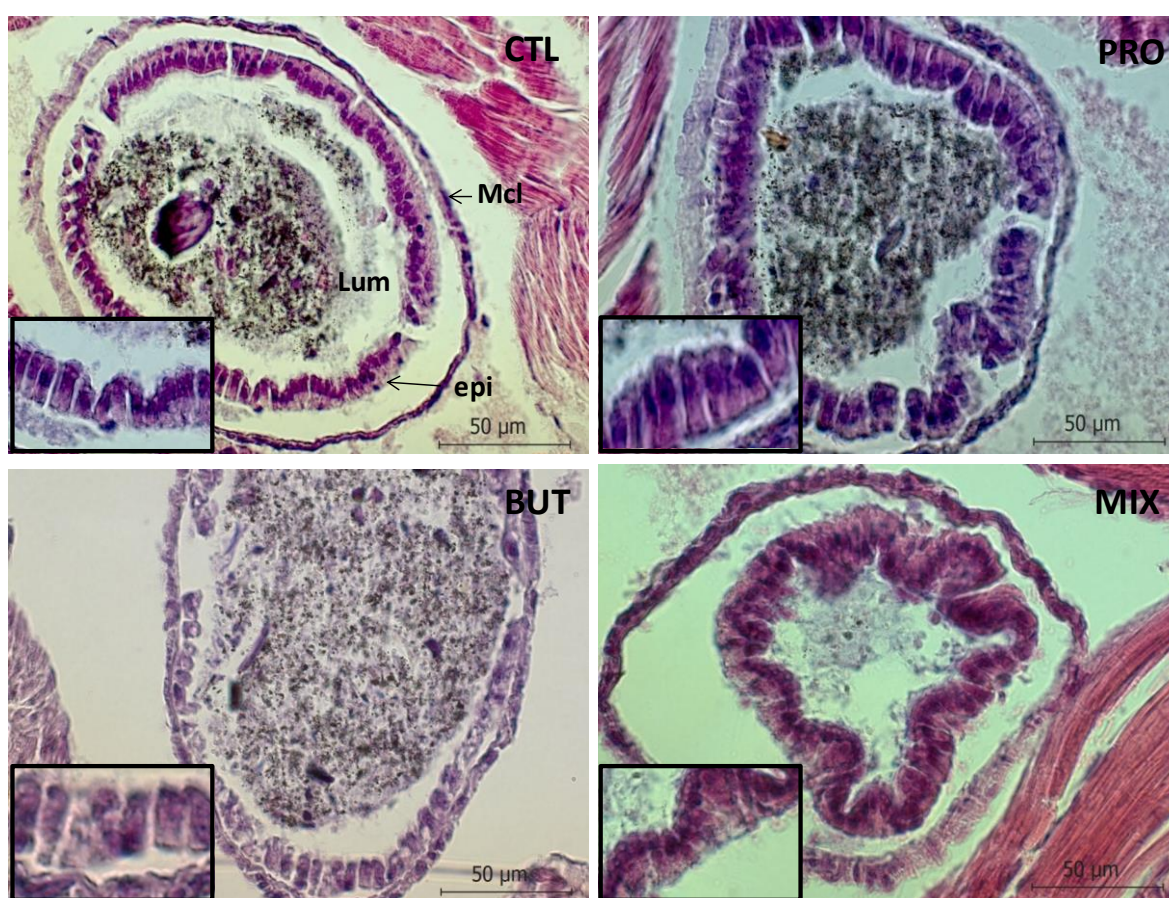


Figura 1 Cortes histológicos do intestino médio de pós-larvas 20 de *Litopenaeus vannamei* alimentadas com dieta suplementada com **BUT**=butirato de sódio 2%; **PRO**=probiótico *Lactobacillus plantarum* 1×10^8 UFC/g; **MIX**=butirato de sódio 2% + probiótico *Lactobacillus plantarum* 1×10^8 UFC/g; e **CTL**=Controle. **epi**=epitélion intestinal, **Mcl**=Músculo circular e longitudinal com estrutura íntegra e **Lum**= Lúmen intestinal contendo alimento.

CONCLUSÃO

A suplementação da dieta com butirato de sódio na concentração de 2% aspergido na ração aumenta a sobrevivência no cultivo de pós-larva 5 até pós-larva 20 do camarão marinho *L. vannamei* sem causar alteração morfológica no intestino médio das pós-larvas 20.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida a Marcello Santos Júnior. Agradecem também ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa concedido ao projeto CNPq/475906/2012-8. Felipe Vieira, Walter Seiffert e José Mouriño receberam bolsa de produtividade de pesquisa do CNPq (números de processos: PQ 309868/2014-9, 302792/2012-0 e 308292/2014-6, respectivamente).

REFERÊNCIAS

- ANDREATTA, E.R e BELTRAE, E. 2004 Cultivo de camarões marinhos. In: Poli, CR.; Poli, A.T.B.; Andreatta, E.R.; Beltrame E. *Aquicultura: Experiências brasileiras*. Multitarefa Editora Ltda., Florianópolis. p.199-220.
- APHA, "WEF. 1995 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. Inc. AWWA. 1192p.
- BARBIERI, E.; DE MEDEIROS, A.M.Z.; HENRIQUES, M.B. 2016. Oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile pink shrimp in culture: temperature effects. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49: 19-25.
- BELL, T.A. e LIGTHNER, D.V. 1988 *A Handbook Of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, 114p.
- BOYD, C.E. e GAUTIER, D. 2000 Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate*, 3: 61-66.
- DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. 2009 Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27: 680-685.
- ENCARNAÇÃO, P. 2010 Varied Feed Additives Improve Gut, Animal Health. *Global Aquaculture Advocate*, 3: 41.
- HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. 2007 Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*. 73: 1309-1317.
- HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2004 *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. NOAA Technical Memorandum, NOS NCCOS 5, Oxford, p.218.
- LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESZIUS, P.H. 2010 Review: Use Of Organic Acids, Salts In Fish Diets. *Global Aquaculture Advocate*, 5: 45-46.
- LÜCKSTÄDTS, C. 2008 The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. *Nutrition and Natural Resources*. 3: 1-8.
- MINE, S. e BOOPATHY, R. 2011 Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 63: 1-7.
- PRABHU, N.M.; NAZAR, A.R.; RAJAGOPAL, S.; KHAN, S.A. 1999 Use of probiotics in water quality management during shrimp culture. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 14: 227-36.
- RAMIREZ N.B.; SEIFFERT, W.Q.; VIEIRA, F.V.; MOURIÑO, J.L.P.; JESUS, G.F.A., FERREIRA, G.S.; ANDREATTA, E.R. 2013 Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48: 913-919.
- SILVA, B.C.; VIEIRA, F.V.; MOURIÑO, J.L.P.; FERREIRA, G.S.; SEIFFERT, W.Q. 2013 Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*, 384-387: 104-110.
- SILVA, B.C.; VIEIRA, F.V.; MOURIÑO, BOLIVAR, N.; SEIFFERT, W.Q. 2016 Butyrate and propionate improve the growth
- Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 42(2): 457-463, 2016

- performance of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture Research*, 47: 612-623.
- SOUZA, D.M.; SUITA, S.M.; LEITE, F.P.L.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E.L.C. 2012 The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research*, 43: 1828-1837.
- VIEIRA, F.D.; PEDROTTI, F.S.; NETO, C.C.B.; MOURINO, J.L.P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M.L.; RAMIREZ, C.; VINATEA, L.A. V. 2007 Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55: 251-255.
- ZIAEI-NEJAD S.; REZAEI, M.H.; TAKAMI, G.A.; LOVETTD, D.L.; MIRVAGHEFI, A.; SHAKOURI, M. 2006 The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252: 516-524.