

Pesquisa de um regime alimentar alternativo ao regime clássico para o cultivo larvar do peixe-zebra (*Danio rerio*) - avaliação dos efeitos na sobrevivência e no crescimento

Olga María Hernández Martínez

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

Porto, 03.12.2012

Orientador:

Prof. António Paulo Alves Ferreira de Carvalho

Professor Auxiliar

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



AGRADECIMENTOS

Há jeitos e sentimentos que as palavras não conseguem descrever quanto menos agradecer... gostaria tentar que aqueles que, das mil maneiras possíveis e imagináveis, fizeram possível este trabalho também tenham cá seu nome, porque me faltam capas para os escrever...

Ao Professor António Paulo Carvalho, pelo seu apoio sempre constante e presente. Sempre disponível, prestável e acessível. Um sincero muito obrigado!!!

Ao Professor Vitor Vasconcelos, pelo seu bem-fazer e tranquilidade, por pôr-me à vontade para a realização deste trabalho.

À minha “pequena família” do CIIMAR, em particular ao Hugo e ao Ricardo, porque direta ou indiretamente este trabalho também é deles, da sua grande dose de amizade e irmandade com um ligeiro tempero de loucura. Ainda bem!

À minha família e amigos “do lado de lá”, *gracias por estar siempre conmigo*.

À minha família e amigos “do lado de cá”, porque me adotaram como uma mais, porque com vocês nunca me sinto estrangeira.

João, não me esqueci. Só não sei... *No sé cómo darte las gracias por todo, por el apoyo, por la paciencia... por tantas cosas que se me agarra por dentro al escribir... ¡Gracias!*

ÍNDICE

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE.....	4
ABSTRACT AND KEY-WORDS.....	5
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ABREVIATURAS	6
INTRODUÇÃO.....	7
Aspetos da biologia do peixe-zebra	7
Distribuição geográfica e habitat	7
Morfologia e dimorfismo sexual	7
Comportamento e reprodução	8
Desenvolvimento e ciclo de vida	9
Utilização do peixe-zebra como modelo experimental.....	10
Aquacultura e regime alimentar larvar do peixe-zebra	12
Justificação e objetivos do presente trabalho	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Ensaio experimentais e protocolo experimental.....	14
Ensaio 1	14
Ensaio 2	15
Obtenção das larvas utilizadas nos ensaios experimentais.....	16
Sistema experimental e condições experimentais.....	17
Alimentos utilizados nos ensaios	20
Descapsulação dos quistos de Artémia	20
Liofilização dos quistos de Artémia	20
Obtenção dos náuplios de Artémia	20
Alimento formulado / ração	21
Análise dos resultados.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
Ensaio 1	22
Ensaio 2	25
CONCLUSÕES GERAIS.....	28
BIBLIOGRAFIA	29

RESUMO

O peixe-zebra, *Danio rerio*, tem tomado relevo na última década da investigação com animais laboratoriais. Porém existe ainda pouca bibliografia que descreva e discuta especificamente aspetos técnicos da sua cultura, ainda menos quando apenas focamos a pesquisa na fase larvar desta espécie. Pelo que o principal objetivo deste trabalho foi estabelecer um método alternativo ao clássico, adequado e simplificado para a criação de peixe-zebra, focado em diferentes regimes alimentares, de modo a estudar a viabilidade de aplicação face ao sucesso obtido.

Desenhou-se uma estrutura de manutenção, construída com materiais disponíveis em lojas de bricolagem e decoração domésticas, e consequentemente acessíveis a qualquer pessoa não especializada em material laboratorial. Assim mesmo, dito material foi relativamente económico, facilitando a sua aquisição. Foi desenvolvido um sistema de criação e manutenção, com capacidade máxima para cerca de 1500 larvas de peixe-zebra, divididas em doze unidades experimentais. Cujas necessidades de recursos humanos é muito reduzida, apenas uma pessoa/dia cerca de 4h/dia.

Com o objetivo de definir uma dieta ótima para a espécie e assim mesmo económica e pouco dispendiosa em questões técnicas e de recursos humanos, foram testados 4 tipos de alimento durante 21 dias e 3 regimes alimentares durante 23 dias, conseguindo atingir com relativo sucesso o objetivo alimentar proposto. De forma que conseguiu-se definir como método sucedido o fornecimento de alimento formulado comercial durante a primeira semana de alimentação exógena, e fornecimento de náuplios de *Artémia* recém-eclodida durante as restantes semanas. Sendo que evita-se a despesa da própria *Artémia*, assim como o tempo empregue em tratar da mesma, com obtenção de juvenis com crescimento paralelo ao obtido noutros regimes alimentares mais dispendiosos.

PALAVRAS-CHAVE

Peixe-zebra, *Danio rerio*, cultivo larvar, regime alimentar clássico, regime alimentar alternativo.

ABSTRACT

The zebrafish, *Danio rerio*, has taken prominence in the last decade of laboratory animals' research. But there is little literature that specifically describes and discusses technical aspects of their culture, even less when we focus only on larval period. Therefore the main objective of this study was to establish an alternative to the classical method, simplified and suitable method to breed zebrafish, focused on different diets in order to study the feasibility of application.

It was designed a maintenance structure, built with materials available in DIY stores and home decor, and therefore accessible to anyone not specialists in laboratory equipment. Also, this material was relatively inexpensive, facilitating their acquisition. It was developed a system to breed and grow, with a capacity of about 1500 larvae of zebrafish, divided into twelve experimental units. The need for human resources is very small, only one person/day about 4h/day.

Aiming to set an optimal diet for the zebrafish and as well economical and inexpensive in technical and human resources, were tested 4 types of food for 21 days and 3 diets for 23 days, achieving the feeding proposed objective with relative success. So that could be defined as a method successful supplying formulated commercial food for the first week feeding period, and supplying Artemia newly hatched during the remaining weeks. Since it avoids the expense of Artemia as well as the time spent on treating it, obtaining very similar growth of juvenile than that obtained in other expensive diets.

KEYWORDS

Zebrafish, *Danio rerio*, larvae breeding, classic diet, alternative diet.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Exemplares da estirpe selvagem (<i>wild-type</i>) de peixe-zebra macho e fêmea. Foto obtida em http://badmanstropicalfish.com
Figura 2	Evolução temporal (1955 - 2011) do número de publicações relativas a estudos com recurso ao peixe-zebra. http://www.hub.sciverse.com/action/home
Figura 3	Esquema dos tratamentos alimentares testados no Ensaio 1.
Figura 4	Esquema dos regimes alimentares testados no Ensaio 2.
Figura 5	Esquema do sistema experimental.
Figura 6	Vista geral do sistema e primeiro plano de uma unidade experimental.
Figura 7	Sobrevivência diária durante o Ensaio 1, das larvas de peixe-zebra, em função do tratamento alimentar.
Figura 8	Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 1, com discriminação colorimétrica em função do tamanho.
Figura 9	Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 1, com discriminação colorimétrica em função do peso.
Figura 10	Sobrevivência diária durante o Ensaio 2, das larvas de peixe-zebra, em função do tratamento alimentar.
Figura 11	Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 2, com discriminação colorimétrica em função do tamanho.
Figura 12	Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 2, com discriminação colorimétrica em função do peso.
Tabela 1	Dados do Ensaio 1 de comprimento total (CT), peso (P), coeficiente de variação do comprimento total e do peso (CVCT e CVP) e sobrevivência das larvas de peixe-zebra (media \pm desvio padrão).
Tabela 2	Dados do Ensaio 2 de comprimento total (CT), peso (P), coeficiente de variação do comprimento total e do peso (CVCT e CVP) e sobrevivência das larvas de peixe-zebra (media \pm desvio padrão).

INTRODUÇÃO

Aspetos da biologia do peixe-zebra

Distribuição geográfica e habitat

O peixe-zebra, *Danio rerio*, é um teleóstio de água doce da família dos Ciprinídeos. Trata-se de uma espécie originária do sul da Ásia, amplamente distribuída por regiões geográficas com clima tipicamente de monção, incluindo várias zonas da Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal, Myanmar e Sri Lanka. Nestas regiões, têm como habitat preferencial massas de água pouco profundas, estagnadas ou lentas, tal como pequenos lagos naturais ou artificiais, canais de regadio e arrozais, embora possam também ocorrer em rios (Engeszer *et al.*, 2007; Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008).

Devido principalmente à facilidade com que pode ser mantido e reproduzido em cativeiro, atualmente o peixe-zebra encontra-se amplamente difundido por todo o mundo, seja pela sua utilização em aquarofilia ou como modelo experimental em várias áreas da biologia e biomedicina.

Morfologia e dimorfismo sexual

O peixe-zebra apresenta um corpo fusiforme, achatado lateralmente, com a boca em posição oblíqua e direcionada para cima (Spence *et al.*, 2008). O tamanho do corpo raramente excede os 40 mm de comprimento standard (CS) / cerca de 50 mm comprimento total (CT) (Spence *et al.*, 2008, Reed & Jennings, 2010). A espécie apresenta um padrão de coloração característico, do qual resulta o seu nome comum, constituído por cinco a sete riscas longitudinais azul-escuro que se estendem do opérculo até à barbatana caudal, sendo a barbatana anal igualmente listada (Fig. 1).

A pigmentação da coloração pode alterar-se, assumindo diferentes tonalidades, em resposta a estímulos visuais e luminosos ou em consequência de determinados comportamentos (por exemplo de agressividade) (Spence *et al.*, 2008, Reed & Jennings, 2010).

Devido a programas de seleção ao nível da aquarofilia e de manipulação genética ao nível laboratorial existem atualmente numerosas estirpes de peixe-zebra, que resultam numa grande variedade principalmente ao nível dos padrões de pigmentação e coloração ou dos formatos das barbatanas.



Figura 1. Exemplos da estirpe selvagem (*wild-type*) de peixe-zebra macho (exemplar de cima) e fêmea (exemplar de baixo). Foto obtida em <http://badmanstropicalfish.com>

O dimorfismo sexual em indivíduos juvenis não é muito evidente. Quando adultos a coloração é semelhante nos dois sexos, embora os machos tendam a apresentar barbatanas anais mais amareladas e maiores. Por outro lado, as fêmeas tendem a ser maiores do que os machos (Spence *et al.*, 2008). No entanto, as fêmeas em estado reprodutivo são identificáveis com elevado grau de fiabilidade pela forma do corpo mais arredondada (maior proeminência ventral) (Figura 1) e pela presença de uma pequena papila genital à frente da zona de implantação da barbatana anal.

Comportamento e reprodução

O peixe-zebra é uma espécie que vive em cardume, desde a fase larvar e ao longo de toda a vida (Engeszer *et al.*, 2007; Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008). Tanto na natureza como em laboratório apresenta um padrão de atividade circadiano sincronizado com os ciclos de luz/obscuridade, encontrando-se ativo (particularmente do ponto de vista alimentar e reprodutivo) durante o período de luz.

Em laboratório, a uma temperatura constante de cerca de 28°C, a espécie reproduz-se ao longo de todo o ano, embora na natureza a reprodução seja marcada por alguma sazonalidade, provavelmente associada à presença de alimento (Engeszer *et al.*, 2007; Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008). Apesar do cultivo do peixe-zebra, incluindo a reprodução, se efetuar de forma generalizada a uma temperatura de cerca de 28°C (Westerfield, 1995; Reed & Jennings, 2010), alguns autores sugerem que uma gama entre 24-30°C será apropriada (Lawrence, 2007).

Normalmente, a atividade de desova começa no primeiro minuto de exposição à luz após o período de obscuridade, prolongando-se por cerca de uma hora (Spence *et al.*, 2008). Contudo, embora esta seja a norma, as desovas não estão estritamente

limitadas às primeiras horas de luz, podendo ocorrer ocasionalmente noutros períodos do dia (Lawrence, 2007).

O peixe-zebra reproduz-se em pares macho/fêmea ou em grupos de número variável de machos e fêmeas. No entanto, a proporção de um macho para duas fêmeas é considerada a ideal para maximizar a produção de ovos em laboratório (Westerfield, 1995). Usualmente, a exposição de machos a fêmeas ao final da tarde é suficiente para a obtenção de ovos na manhã do dia seguinte. Nestas condições são produzidas posturas de forma contínua, em intervalos frequentes mas irregulares. Cada fêmea pode desovar a cada 2-3 dias, emitindo entre alguns ovos a várias centenas de ovos por postura (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008; Reed & Jennings, 2010).

Na natureza, as posturas ocorrem preferencialmente em substratos de cascalho/areão ou entre a vegetação, o que estará relacionado com a possibilidade de uma melhor oxigenação dos ovos e/ou de proteção contra a sua predação (Spence *et al.*, 2008). Em laboratório é usual recorrer-se à colocação de pequenos berlines de vidro sobre o fundo ou fundo falso do aquário (Westerfield, 1995; Lawrence, 2007; Reed & Jennings, 2010), evitando-se dessa forma também o canibalismo por parte dos progenitores. Os ovos ($\pm 0,7$ mm de diâmetro, demersais e não adesivos) após serem emitidos pelas fêmeas diretamente sobre o substrato são fertilizados pelos espermatozoides libertados pelos machos, ficando a incubar até à eclosão, sem que ocorra qualquer tipo de cuidado parental (Spence *et al.*, 2008).

Desenvolvimento e ciclo de vida

O desenvolvimento e ciclo de vida do peixe-zebra encontram-se pormenorizadamente descritos, em virtude da sua ampla utilização como modelo experimental. De seguida, destacam-se alguns dos aspetos mais relevantes tendo em consideração o cultivo desta espécie, o qual é efetuado à temperatura de 28-28,5°C.

A eclosão dos ovos ocorre entre 48-72 h pós-fertilização (Kimmel *et al.*, 1995). As larvas recém-eclodidas (± 3 mm de comprimento), após um período inicial em que permanecem no fundo do aquário, aderem às paredes por meio de células secretoras da epiderme da região cabeça e movimentam-se progressivamente até à zona de interface água-ar, onde ingerem o ar necessário para a adequada insuflação da bexiga-natatória (Goolish & Okutake, 1999). A partir dessa altura as larvas ($\pm 3,7$ mm CS) tornam-se nadadoras livres e começam a exibir comportamentos alimentares e de fuga.

Alimentadas à base de presas vivas fornecidas a partir do 6º dia pós-fertilização (após esgotamento das reservas vitelinas), as larvas triplicam de tamanho em cerca de três semanas (atingindo ± 11 mm CS) e adquirem escamação completa, padrão de coloração definitivo e sistema de barbatanas semelhante ao adulto. Nesta altura considera-se que ocorre a transição para a fase juvenil (Parichy *et al.*, 2009).

A maturação sexual/reprodutiva do peixe-zebra ocorre por volta dos 90 dias pós-fertilização, embora haja evidências de que esteja mais relacionada com o tamanho (a partir de ± 23 mm CS) do que com a idade (Spence *et al.*, 2008). A partir dos dois anos de idade verifica-se um decréscimo considerável da capacidade reprodutiva (Westerfield, 1995; Reed & Jennings, 2010).

Em laboratório, o peixe-zebra atinge um tamanho máximo que varia entre 35 e 40 mm CS (Reed & Jennings, 2010) e uma longevidade de 3,5 a 5,5 anos (Gerhard *et al.*, 2002). Após o segundo ano em cativeiro começa a verificar-se um aumento da incidência de anomalias da coluna vertebral (cifose, lordose e escoliose) na população (Spence *et al.*, 2008), que parecem dever-se a degenerescência muscular e estar associadas ao envelhecimento dos indivíduos (Parichy *et al.*, 2009). Em populações selvagens estas anomalias não são observadas, pelo que se pensa que os indivíduos na natureza morrerão antes que elas se manifestem (Spence *et al.*, 2008).

Utilização do peixe-zebra como modelo experimental

O peixe-zebra destaca-se atualmente como um dos mais importantes organismos modelo em diversas áreas da biologia e da biomedicina, incluindo no estudo de doenças humanas. Tal decorre de um conjunto de características que o tornam um vertebrado particularmente apropriado para uso experimental (Westerfield, 1995; Lawrence, 2007; Reed & Jennings, 2010), das quais se salienta:

- facilidade e baixo custo de manutenção em laboratório - uma vez que é um peixe pequeno é possível manter centenas ou mesmo alguns milhares de indivíduos em instalações relativamente reduzidas e de forma mais económica comparativamente com outros vertebrados (por exemplo roedores);
- reprodução em cativeiro ao longo de todo o ano, possibilitando a obtenção de grande número de embriões numa base diária;

- tempo de geração curto (cerca de 3 meses), facilitando experiências envolvendo várias gerações;
- produção de ovos de tamanho considerável e óticamente transparentes, facilitando o acesso aos embriões e a sua manipulação, assim como a monitorização dos diversos estágios de desenvolvimento embrionário;
- desenvolvimento embrionário rápido, permitindo seguir a formação dos principais órgãos em cerca de 36 horas;
- similaridades genéticas com os humanos, tornando-o particularmente importante como modelo no estudo de doenças humanas.

Pelas vantagens apontadas, centenas de laboratórios por todo o mundo vêm utilizando cada vez mais, e de forma rotineira, o peixe-zebra em investigação fundamental e aplicada. O aumento exponencial verificado nas últimas duas décadas do número de publicações relativas a estudos em que o peixe-zebra foi utilizado confirma a importância crescente desta espécie como modelo experimental (Figura 2).

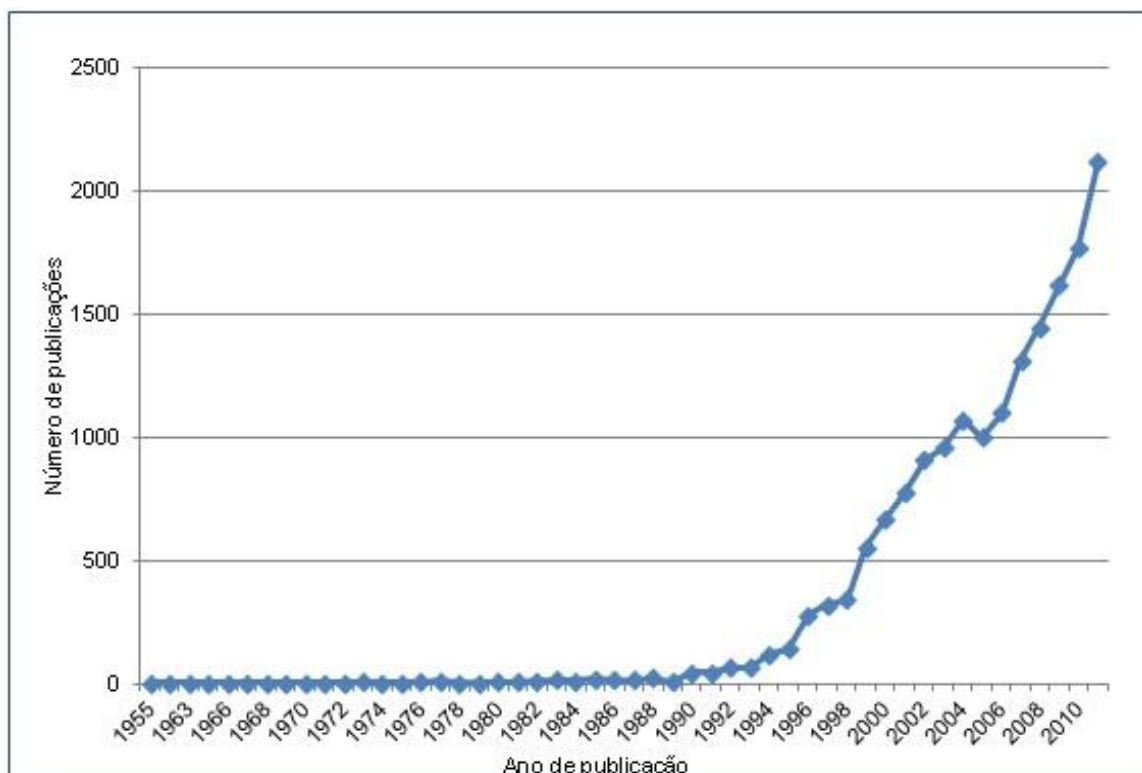


Figura 2. Evolução temporal (1955 - 2011) do número de publicações relativas a estudos com recurso ao peixe-zebra. Pesquisa efetuada em <http://www.hub.sciverse.com/action/home>; cujo título, resumo ou palavra-chave contenha peixe-zebra, desde o início da base de dados até 2011, inclusive ("query : (TITLE-ABS-KEY(zebrafish) year < 2012)").

Aquacultura e regime alimentar larvar do peixe-zebra

Apesar da utilização generalizada do peixe-zebra como modelo experimental e dos consideráveis custos económicos associados à sua produção em grande escala, o cultivo desta espécie tem merecido uma atenção escassa por parte da comunidade científica (Lawrence, 2007). De facto, muitos dos procedimentos empregues no cultivo do peixe-zebra são meramente empíricos, variam consoante o laboratório e/ou são baseados, muitas vezes desadequadamente, nas técnicas de cultivo de espécies comerciais.

A inexistência de procedimentos standard específicos no cultivo do peixe-zebra poderá ter consequências duplamente negativas: do ponto de vista da produção, levando a uma produção sub-ótima, e do ponto de vista científico, não assegurando uniformidade na qualidade dos indivíduos usados em diferentes ensaios experimentais, o que pode dificultar a comparação de resultados e conduzir a conclusões desajustadas. Assim, o estabelecimento de procedimentos standard, validados cientificamente, é considerado um aspeto prioritário na aquacultura do peixe-zebra. Nesse sentido, o cultivo larvar e, particularmente, a alimentação das larvas, é uma das áreas que reconhecidamente necessitam de mais investigação (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008; Reed & Jennings, 2010).

A prática clássica no que respeita ao regime alimentar larvar do peixe-zebra envolve a alimentação das larvas com ciliados (*Paramecium*) durante um período inicial, seguida de náuplios de *Artémia* (Westerfield, 1995). A utilização deste regime implica a necessidade de se proceder ao cultivo de ciliados, com os respetivos custos de trabalho e económicos associados. Por outro lado, o facto do cultivo de ciliados requerer água rica em matéria orgânica, parte da qual acaba por ser introduzida nos tanques de cultivo larvar levando ao decréscimo da qualidade da água em que as larvas são mantidas, pode ter um impacto negativo na sua sobrevivência (Spence *et al.*, 2008). Além disso, a qualidade nutricional dos ciliados não está confirmada e a sua utilização como único alimento é incapaz de suportar a sobrevivência das larvas até à fase juvenil (Lawrence, 2007). Pelo contrário, vários estudos têm demonstrado que os ciliados podem ser dispensados do esquema alimentar das larvas do peixe-zebra, sem prejuízo ou mesmo com vantagens muito significativas em termos de sobrevivência e crescimento larvar (Carvalho *et al.*, 2006; Gómez-Requeni *et al.*, 2010; Best *et al.*, 2010; Hensley & Leung, 2010; Kaushik *et al.*, 2011). Apesar de tudo isto, e embora possam existir pequenas variações, a prática corrente nos laboratórios consiste na utilização do regime clássico, com recurso aos ciliados.

Justificação e objetivos do presente trabalho

Como foi mencionado, o regime alimentar correntemente utilizado no cultivo larvar do peixe-zebra carece de validação científica e, como indicam os resultados de vários trabalhos, poderá ser melhorado a vários níveis. O estabelecimento de um regime alimentar mais simples, mais económico e que conduza a melhores e mais fiáveis resultados zootécnicos será, por isso, um passo importante do ponto de vista estrito da produção, mas também do ponto de vista científico tendo em consideração a utilização desta espécie como modelo experimental.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo propor um regime alimentar standard para o cultivo larvar do peixe-zebra, alternativo àquele que é classicamente utilizado, tendo em conta a procura de maior simplicidade, maior economia e melhores resultados zootécnicos. Para tal, o trabalho envolve duas etapas:

- um primeiro ensaio em que serão fornecidos vários tipos de alimentos (náuplios de *Artémia*, quistos descapsulados de *Artémia* frescos ou liofilizados, ração comercial) fornecidos isoladamente ao longo de toda a fase larvar, avaliando-se o seu efeito sobre a sobrevivência, o crescimento e a homogeneidade das larvas.
- um segundo ensaio, planeado na sequência dos resultados obtidos no primeiro ensaio, com vista ao refinamento do regime alimentar e consequente melhoria dos resultados obtidos previamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio experimental e protocolo experimental

ENSAIO 1

O Ensaio 1 teve como objetivo testar o efeito de vários alimentos no crescimento e sobrevivência das larvas. Larvas com 5 dias pós-fertilização, próximas do esgotamento das reservas vitelinas, foram distribuídas aleatoriamente por 12 tanques de 5 L de capacidade, num sistema de recirculação de água (ver descrição adiante), perfazendo um total de 98 larvas/tanque.

A cada grupo de 3 tanques correspondeu um tratamento alimentar, segundo o esquema representado na Figura 3, testando-se assim 4 tratamentos alimentares em triplicado: náuplios recém-eclodidos de *Artémia* (N), quistos descapsulados frescos de *Artémia* (QF), quistos descapsulados liofilizados de *Artémia* (QL) e alimento formulado/ração (R). O período experimental foi de 22 dias, ao longo do qual os alimentos foram fornecidos diariamente, repartidos em duas refeições (manhã e tarde), num total de 20000 a 22000 presas/tanque/dia no caso dos náuplios e dos quistos de *Artemia* e 100 mg/tanque/dia no caso da ração. Durante os 22 dias foi distribuída sempre a mesma quantidade de alimento/tanque/dia.

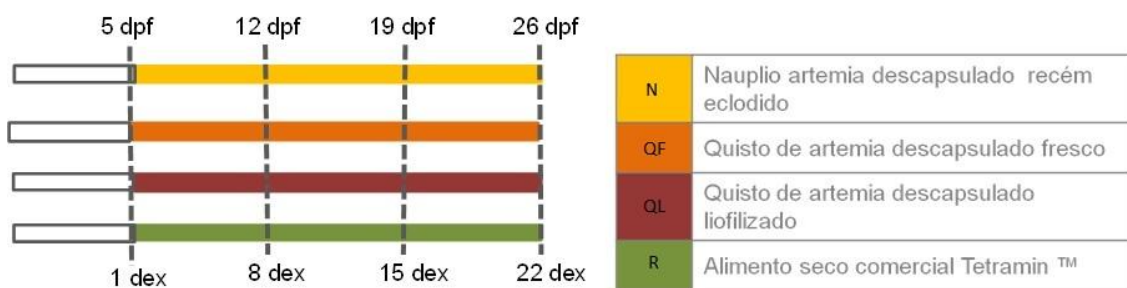


Figura 3 – Esquema dos tratamentos alimentares testados no Ensaio 1 (dpf: dias pós-fertilização; dex: dias experimentais).

Diariamente, em cada tanque, as larvas mortas eram retiradas e o seu número era registado. Em dias alternados as larvas sobreviventes eram transferidas para um tanque limpo, de acordo com o procedimento descrito por Charlon & Bergot (1984) (ver descrição adiante). Nos dias em que as larvas não eram transferidas para tanques limpos, efetuava-se uma ligeira sifonagem do fundo dos tanques.

No final do ensaio todas as larvas sobreviventes de cada tanque foram recolhidas, eutanasiadas com éter etilenoglicolmonofenílico 0,3 mL/L, contadas, pesadas

individualmente e, de seguida, preservadas em etanol 70%. Os exemplares preservados foram posteriormente fotografados individualmente com uma câmara digital (Canon PowerShot-A60) acoplada a uma lupa binocular (Zeiss Stemi DV4). As imagens obtidas foram usadas para determinação do comprimento total (CT) dos indivíduos com recurso ao *software* UTHSCSA ImageTool 3.0. Os valores individuais do peso e do CT de todas as larvas sobreviventes no final do ensaio foram usados para determinação dos respetivos coeficientes de variação, permitindo avaliar a homogeneidade dos lotes quanto ao peso e tamanho dos indivíduos.

ENSAIO 2

O Ensaio 2 foi planeado na sequência dos resultados obtidos no Ensaio 1, tendo por objetivo refinar o protocolo de alimentação das larvas. De forma similar ao Ensaio 1, larvas com 5 dias pós-fertilização foram distribuídas aleatoriamente por 9 tanques de 5 L de capacidade, no mesmo sistema de recirculação de água (ver descrição adiante), perfazendo um total de 108 larvas/tanque. Para o efeito, foram testados em triplicado três regimes alimentares, representados na Figura 4, e como a seguir se explicam:

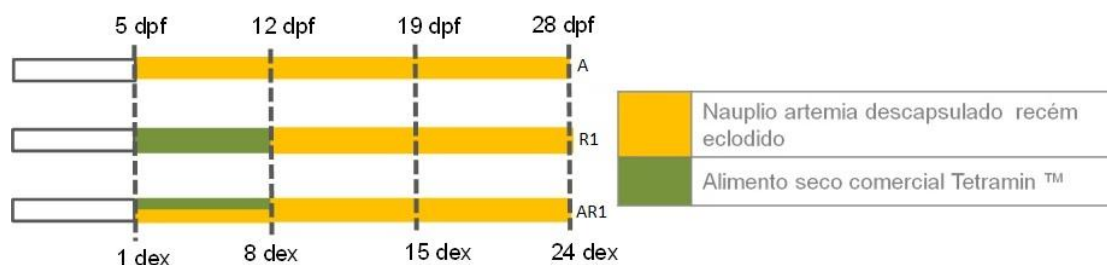


Figura 4 – Esquema dos regimes alimentares testados no Ensaio 2 (dpf: dias pós-fertilização; dex: dias experimentais).

- 1) Regime A: constituído por náuplios recém-eclodidos de *Artémia* (20000 a 22000 presas/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) durante todo o período experimental (24 dias);
- 2) Regime R1: constituído por alimento formulado/ração (100 mg/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) durante a 1ª semana e náuplios recém-eclodidos de *Artémia* (20000 a 22000 presas/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) nas duas semanas seguintes;

3) Regime AR1: constituído por uma mistura de alimento formulado (50 mg/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) e náuplios recém-eclodidos de *Artémia* (cerca de 10000 presas/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) durante a 1ª semana. Posteriormente, apenas náuplios recém-eclodidos de *Artémia* (20000 a 22000 presas/tanque/dia repartidos em duas refeições diárias) nas duas semanas seguintes.

O restante protocolo experimental manteve-se idêntico ao do Ensaio 1.

Obtenção das larvas utilizadas nos ensaios experimentais

Num aquário de vidro com cerca de 80 L de água acondicionada a 28,5 °C, e com injeção de ar ambiental através de uma pequena pedra difusora, foi colocada uma “gaiola de reprodução”. Esta gaiola é formada por um aquário de vidro de cerca de 30 L de capacidade, cujo vidro do fundo foi removido e substituído por uma rede com poro de malha de cerca de 0,5 cm. O fundo de rede da gaiola foi coberto com berlindes de vidro cerca de 1 cm de diâmetro. Esta gaiola de reprodução permanece mergulhada no aquário de 80 L, porém suspensa para que aquando das posturas os ovos atravessem o seu fundo de rede e se depositem no fundo do aquário maior.

Na tarde (cerca das 18 h) da véspera do dia estabelecido para a reprodução, um conjunto de reprodutores (30 machos e 30 fêmeas) mantido com um fotoperíodo de 14 h luz/10 h obscuridade foi transferido para a gaiola de reprodução. Esta transferência foi efetuada cerca de 3h após a alimentação, para evitar a deposição de fezes e restos de alimentação no fundo do tanque externo à gaiola, de modo a limitar o aparecimento de fungos no local de recolha dos ovos.

Na manhã seguinte, algumas horas após o início da iluminação os reprodutores foram removidos da gaiola de reprodução e recolocados no aquário de manutenção de proveniência, e a gaiola de reprodução foi removida do aquário de 80 L.

Os ovos depositados no aquário de 80 L foram removidos com recurso a sifonagem suave através de uma vareta de vidro com ponta e tubo de silicone de 5mm de diâmetro e colocados em gobelés de vidro de 1 L. Procedeu-se então à separação e lavagem dos ovos viáveis em água do sistema previamente acondicionada, eliminando-se os não fecundados. Com recurso a pequenas pipetas plásticas descartáveis de 3 mL e a placas plásticas de contraste (branca/preta) foram separados, limpos e escolhidos 1500 ovos no Ensaio 1 e 1200 no Ensaio 2. Estes ovos foram mantidos em gobelés de vidro de 250 mL, tendo-se efetuado três lavagens

e troca de água diariamente durante os primeiros 4 dias. No 5º dia foram separados para os tanques experimentais, segundo descrito anteriormente.

Sistema experimental e condições experimentais

Os ensaios foram realizados num sistema fechado com recirculação de água (Fig. 5) semelhante ao descrito por Charlon & Bergot (1984), dotado de filtro mecânico e biológico, com regulação térmica a $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo a 14 horas de luz.

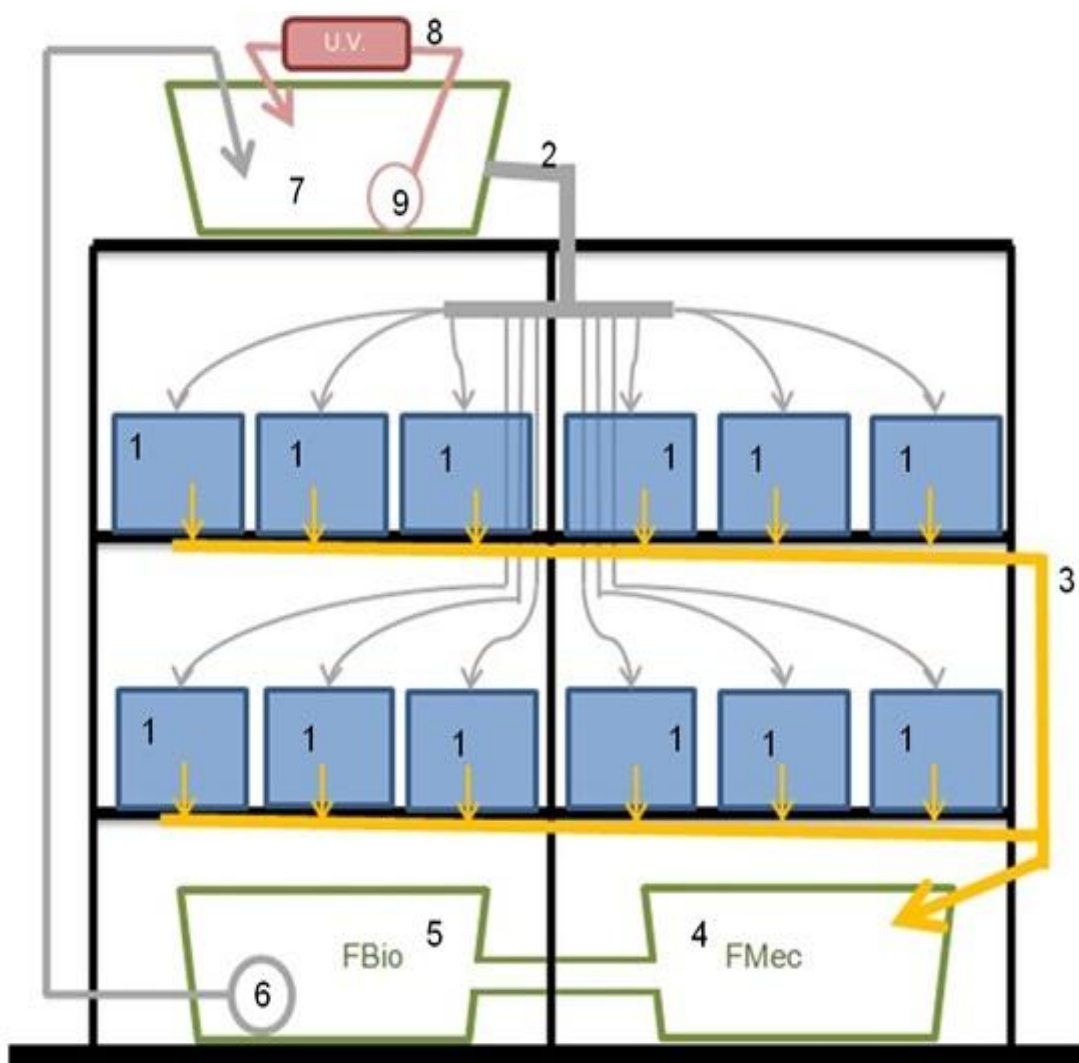


Figura 5. Esquema do sistema experimental (adaptado de Charlon & Bergot, 1984). 1 - unidades experimentais; 2 - tubagem de distribuição de água; 3 - caleira de recolha de água; 4 - reservatório inferior de água, com filtro mecânico (FMec); 5 - reservatório inferior de água, com filtro biológico (FBio); 6 - bomba de água; 7 - reservatório superior de água; 8 - sistema de lâmpada UV; 9 - bomba de recirculação de água para sistema de lâmpada UV.

A água é distribuída para as unidades experimentais a partir de uma tubagem superior e recolhida por uma caleira inferior. A água recolhida pela caleira inferior é conduzida para um reservatório inferior com 40 L de volume, no qual estão colocadas esponjas e lã de vidro que atuam como filtros mecânicos retendo partículas que se encontrem em suspensão à saída das unidades experimentais. Em seguida, a água passa através de uma tubagem comunicante para um novo reservatório paralelo ao anterior com 40 L de volume, onde se encontram cerca de 2 L de biobolas que sustentam o filtro biológico; para este reservatório é também conduzido o excesso de água proveniente da caleira superior. Do reservatório inferior a água é bombeada para um reservatório superior (com 40 L de volume), por intermédio de uma bomba elétrica, e, por gravidade, passa deste para a caleira superior, após ter sido esterilizada ao atravessar um filtro de raios UV, iniciando-se novamente o circuito. O aquecimento da água é feito através de três resistências controlada por termóstatos próprios mergulhadas nos reservatórios inferiores e no reservatório de distribuição. O fotoperíodo é regulado recorrendo ao uso de um temporizador acoplado às lâmpadas fluorescentes situadas na sala experimental.

Cada unidade experimental, na qual são colocadas as larvas, é constituída por dois tanques de plástico: um interior, mais pequeno (volume de 5 L), cujas paredes laterais são formadas por uma rede com 250 µm de malha, e outro exterior, maior (volume de 11 L), servindo para a manutenção do nível da água, uma vez que possui uma abertura por onde sai a água para a caleira inferior.

Este tipo de unidades experimentais facilita a transferência – preferencialmente diária - das larvas para tanques limpos, de modo a evitar a acumulação do excesso de alimento e dos dejetos produzidos. Para tal, o tanque interior, onde as larvas se encontram, é levantado lentamente de modo a que a água escoe pelas redes que revestem as suas paredes e as larvas fiquem concentradas num pequeno volume de água num dos cantos do tanque; de seguida esta água era cuidadosamente vertida juntamente com as larvas para uma nova unidade experimental (conjunto de dois tanques, interior e exterior), previamente atestada com água limpa, retirada do reservatório inferior do sistema. Com este procedimento praticamente todos os resíduos orgânicos e a película bacteriana que se forma no fundo dos tanques permanecem na unidade experimental que estava a ser usada, a qual é então devidamente lavada para utilização no dia seguinte.

O sistema experimental foi desenhado especificamente para este projeto, mas é suficientemente versátil como para ser utilizado noutros projetos similares. A estrutura do sistema tem cerca de dois metros de comprimento, por dois metros de altura total e

cerca de meio metro de largura. Na Figura 6 apresenta-se uma vista geral do sistema e um primeiro plano de uma das unidades experimentais.

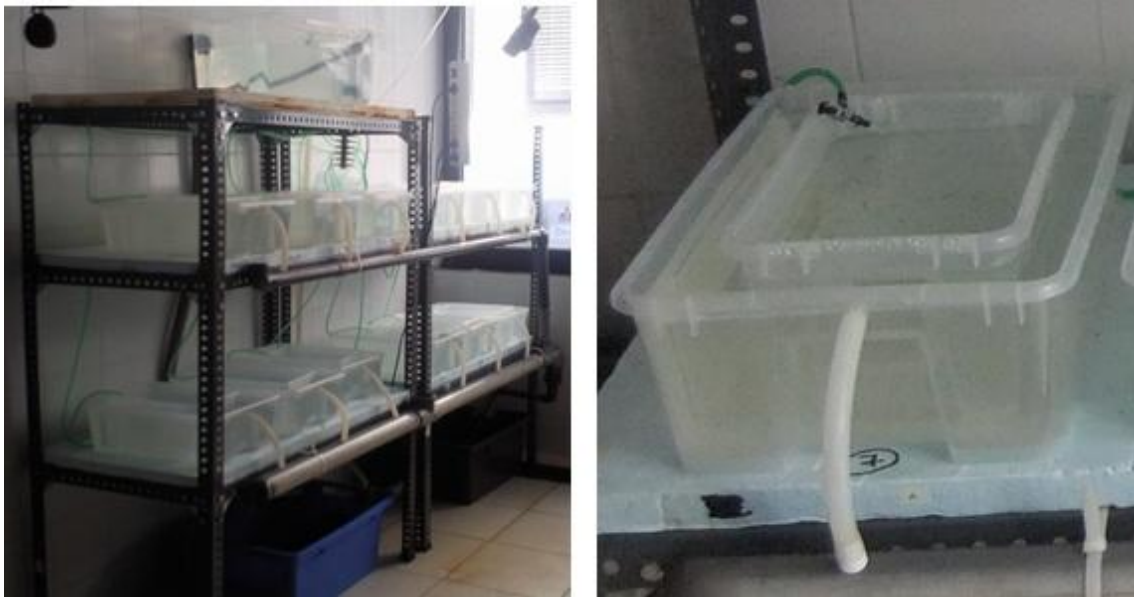


Figura 6. Vista geral do sistema (à esquerda) e primeiro plano de uma unidade experimental (à direita).

A temperatura da água foi controlada e registada diariamente, através de termómetros de álcool colocados em cada uma das unidades experimentais assim como nos tanques que formam o sistema de filtragem, mantendo-se a $28,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

O pH e a concentração de oxigénio dissolvido na água também foram medidos 2 a 3 vezes por semana, em ambos os casos com recurso à utilização do equipamento multiparamétrico portátil *Hach Lange HQ40D*. O pH manteve-se estável a $7 \pm 0,5$ e o oxigénio dissolvido a 8 ± 1 mg/L.

A amónia e o nitrito, compostos azotados mais tóxicos para os peixes que formam parte do ciclo do azoto em ecossistemas aquáticos, foram avaliados 3 a 4 vezes por semana, com recurso a o fotómetro *Palintest Photometer 7000se*. Consoante necessário em função da concentração destes compostos, foram efetuadas trocas parciais de água do sistema previamente condicionada, nomeadamente no que diz respeito à temperatura, à concentração de cloro e à concentração de carbonatos. Em ambos os ensaios, os níveis de amónia mantiveram-se inferiores a 0,55 mg/L. No caso do nitrito, com exceção de um pico de 1,4 mg/L durante 48h no Ensaio 2, controlado com recurso a trocas parciais da água do sistema, os níveis mantiveram-se abaixo de 0,6 mg/L.

Alimentos utilizados nos ensaios

Descapsulação dos quistos de *Artémia*

Os quistos de *Artémia*, quer este organismo tenha sido utilizado na forma de náuplio recém-eclodido ou de quisto, foram sempre previamente descapsulados. A descapsulação dos quistos de *Artémia* foi efetuada com base no método proposto por Sorgeloos *et al.* (1977). Resumidamente, os quistos eram hidratados em água do mar durante cerca de 90 minutos e seguidamente recolhidos por filtração e colocados em 100 mL de uma solução tampão (6 mL NaOH 40% + 94 mL de água do mar). Adicionavam-se então 200 mL de lixívia comercial (refrigerada) e, mantendo os quistos em suspensão por agitação, deixava-se atuar durante 2 a 4 minutos. Depois de recolhidos por filtração, os quistos eram lavados abundantemente com água da torneira e, após a lavagem, colocados numa solução de ácido acético 0,6% durante 1 minuto sob agitação. Finalmente os quistos eram recolhidos por filtração e, de novo, abundantemente lavados com água da torneira. Assim descapsulados, os quistos foram armazenados a 4 °C numa solução de NaCl 15% até posterior utilização, fosse para incubação, ou para fornecimento como quistos frescos. No caso dos quistos liofilizados, procedia-se à lavagem dos quistos frescos com água da torneira seguida de água destilada, prosseguiu para liofilização.

Liofilização dos quistos descapsulados

No caso dos quistos liofilizados, procedia-se à lavagem dos quistos frescos com água da torneira e depois com água destilada. De seguida a dose diária para cada unidade experimental era colocada num *ependorf*, congelada e finalmente liofilizada.

Obtenção dos náuplios de *Artémia*

Os náuplios de *Artémia* usados como alimento das larvas foram obtidos através da incubação de quistos disponíveis comercialmente (INVE, EG). A incubação da dose diária de quistos descapsulados foi feita durante 16h num recipiente cilindro-cónico com água do mar previamente filtrada (através de filtros mecânicos de 100 e 25 µ), em condições de iluminação contínua e aerificação intensa a partir do fundo, num banho-maria a cerca de 28°C. Após a eclosão, os náuplios eram recolhidos por filtração com rede de 100 µm de malha e lavados com água destilada antes de serem fornecidos às larvas.

Alimento formulado / ração

O alimento formulado testado foi uma ração comercial para peixes de uso corrente em aquarofilia - TetraMin (Tetra GmbH), que é também utilizada de forma generalizada na manutenção do peixe-zebra em laboratório. De acordo com o fabricante, este alimento tem a seguinte composição aproximada: 47% de proteína, 10% de gordura, 11% de cinzas e 6% de humidade.

Este alimento é vendido sobre a forma de flocos laminados (escamas). Para poder ser usado na alimentação das larvas ele era previamente reduzido a pequenas partículas por trituração num moinho de café, e de seguida peneirado através de uma bateria de crivos de malha apropriada de modo a obter partículas de 100-200 µm de diâmetro, adequadas à abertura da boca das larvas.

Análise dos resultados

Os valores dos parâmetros determinados nos ensaios foram submetidos a análise de variância (quando necessário após as transformações adequadas para homogeneizar as variâncias), seguida do teste de Tukey sempre que eram detetadas diferenças para um nível de significância de 0,05. Todas as análises foram efetuadas recorrendo ao programa *IBM SPSS Statistics 19*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO 1

Segundo é possível observar na Figura 7 e na Tabela 1, durante a primeira semana de alimentação exógena apenas o grupo alimentado com quistos frescos (QF) sofreu uma mortalidade elevada e estatisticamente significativa face ao resto dos tratamentos. Ainda durante esta primeira semana, e embora não seja significativa, existe uma pequena diferença positiva na sobrevivência do grupo alimentado com alimento formulado (R). A mortalidade na segunda semana mantém-se estatisticamente significativa apenas no tratamento QF, porém no tratamento R inverteu-se a tendência da primeira semana, com um aumento da mortalidade. Durante a terceira semana as tendências foram mantidas, de forma que no fim do Ensaio 1 a maior mortalidade foi sofrida pelo grupo QF, e embora o resto dos tratamentos não apresente diferenças estatisticamente significativas, existe uma ligeira diferença com o grupo R, cuja mortalidade é ligeiramente maior do que nos grupos dos quistos liofilizados (QL) e dos náuplios de *Artémia* (N).

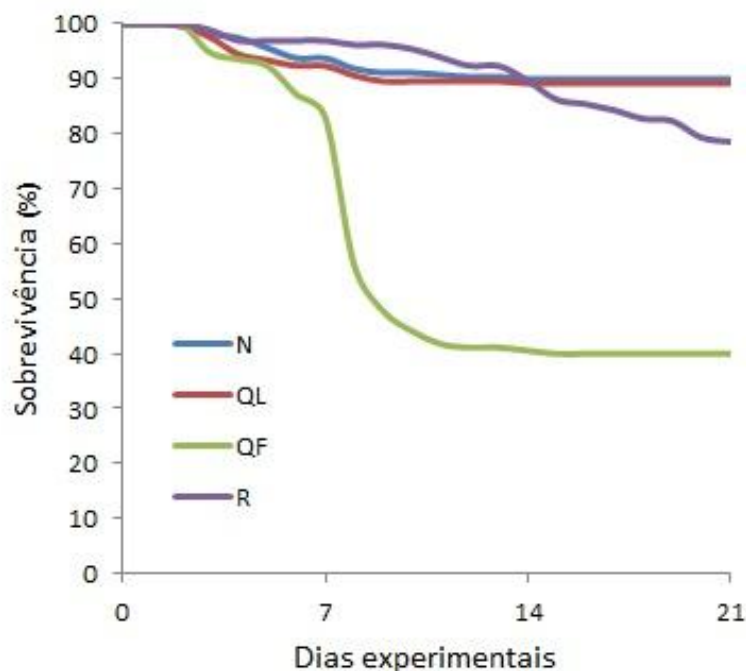


Figura 7. Sobrevivência diária durante o Ensaio 1, das larvas de peixe-zebra, em função do tratamento alimentar (N - náuplios de *Artémia*; QL - quistos liofilizados; QF - Quistos frescos; R - alimento formulado/ração).

Alimento Ensaio 1	N	QF	QL	R
CT (mm)	13,6 ^b ± 0,4	15,9 ^a ± 0,3	11,1 ^c ± 0,3	7,0 ^d ± 0,6
P (mg)	20,8 ^b ± 1,4	36,2 ^a ± 1,8	12,2 ^c ± 0,4	2,8 ^d ± 0,5
CVCT (%)	19,1 ^{a,b} ± 1,3	22,2 ^a ± 1,1	17,3 ^b ± 0,6	16,3 ^b ± 2,5
CVP (%)	52,3 ± 2,5	56,6 ± 7,0	58,5 ± 2,1	55,6 ± 3,7
Sobrevivência (%)				
1ª semana	92 ^a ± 2	56 ^b ± 15	91 ^a ± 6	96 ^a ± 1
2ª semana	90 ^a ± 3	40 ^b ± 13	89 ^a ± 7	86 ^a ± 4
3ª semana	90 ^a ± 3	40 ^b ± 13	89 ^a ± 7	79 ^a ± 10

Valores na mesma linha partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

Tabela 1. Dados do Ensaio 1 de comprimento total (CT), peso (P), coeficiente de variação do comprimento total e do peso (CVCT e CVP) e sobrevivência das larvas de peixe-zebra (media ± desvio padrão).

O crescimento atingido pelas larvas, e avaliado através do tamanho (comprimento total – CT) e do peso (P) (Figura 8, Figura 9 e Tabela 1), é estatisticamente diferente em todos os tratamentos. Sendo que o tratamento que apresenta maior crescimento é o QF, seguido do N. Porém o tratamento com menos sucesso neste ponto é, com muita diferença face aos outros, o tratamento R.

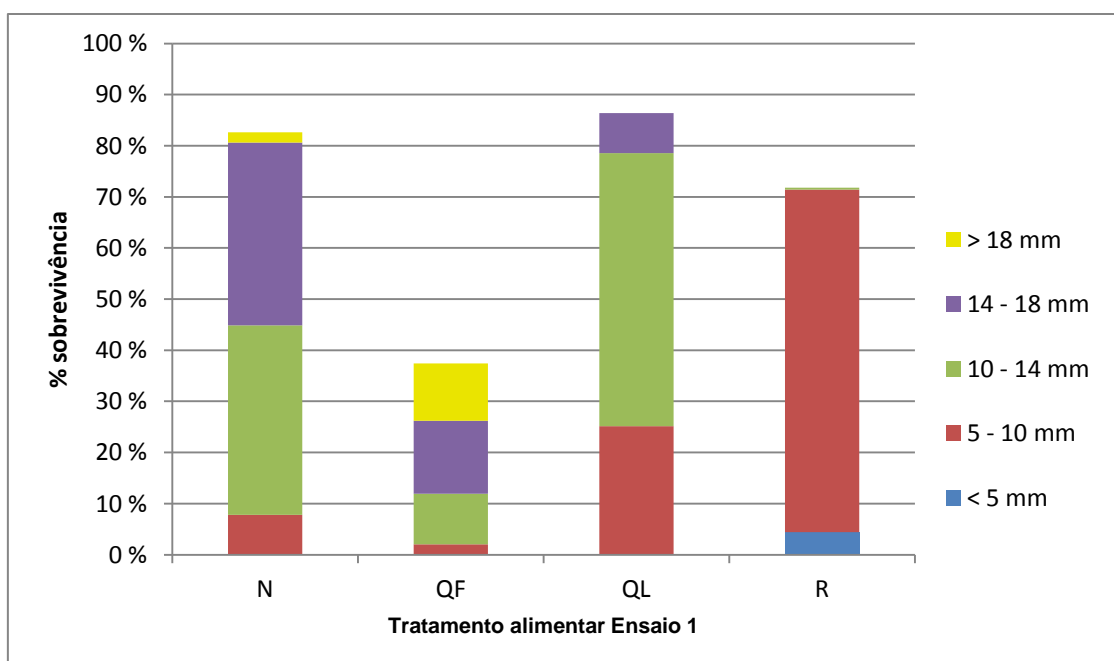


Figura 8. Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 1, com discriminação colorimétrica em função do tamanho.

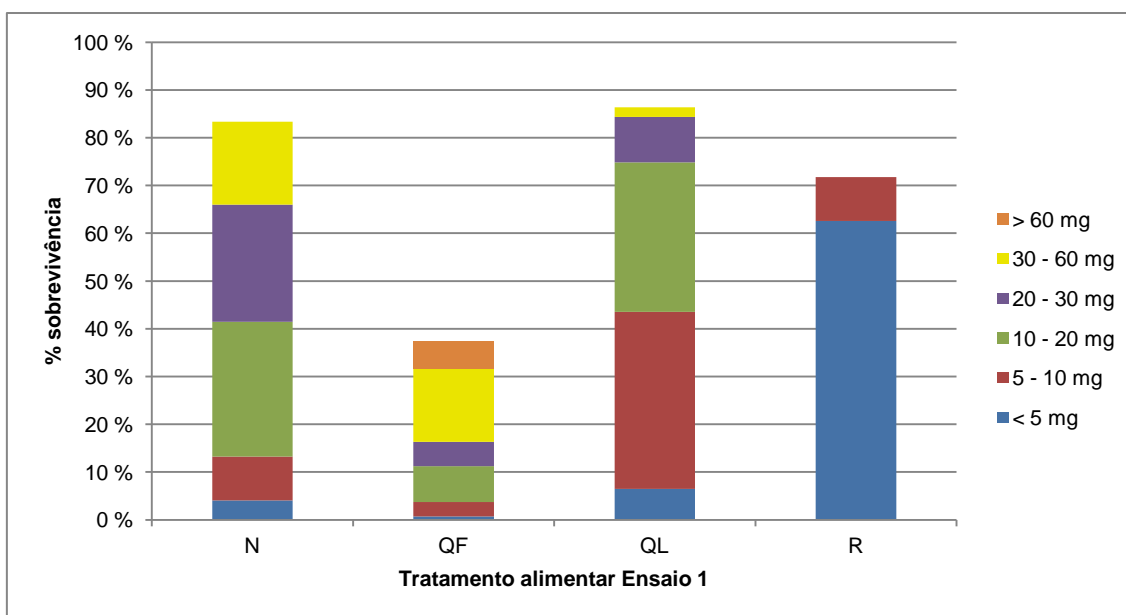


Figura 9. Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 1, com discriminação colorimétrica em função do peso.

A homogeneidade no tamanho atingido pelas larvas de cada tratamento (Tabela 1, CVCT) é considerável, sendo que os tratamentos QL e R não são estatisticamente diferentes entre si e o grupo N não é diferente de qualquer um dos outros grupos. Sendo o grupo mais homogêneo, com respeito ao comprimento total, o QF. Quando considerada a homogeneidade respeito ao peso (Tabela 1, CVP), não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos do Ensaio 1.

A mortalidade referida no grupo QF, principalmente durante a primeira semana, pode dever-se aos próprios quistos afundarem e as larvas não terem capacidade de procura, pelo que não são capazes de se alimentarem, o qual não ocorre nos outros tratamentos. Precisamente neste sentido, o alimento formulado parece ser o mais equitativo em termos de distribuição nas unidades experimentais, pelo que a grande maioria das larvas consegue alimentar-se o qual deriva numa melhor sobrevivência durante as primeiras duas semanas. Porém a qualidade nutricional do alimento formulado é muito menor, pelo que quando as larvas parecem começar a precisar de outra qualidade e quantidade nutricional este alimento não chega para cobrir as necessidades e ocorre um aumento de mortalidade, posteriormente as larvas sobreviventes são muito mais pequenas do que nos outros tratamentos. O facto do grupo QF apresentar um crescimento muito superior aos outros grupos pode dever-se a dois pontos essenciais, uma maior disponibilidade de presas e uma maior disponibilidade de espaço nas unidades experimentais, uma vez que a mortalidade da primeira semana é muito significativa. Assim mesmo, também confirma-se a não

obrigatoriedade de administrar ciliados durante os primeiros dias de alimentação exógena larvar assim como a potencialidade dos quistos descapsulados como forma de substituição do regime alimentar clássico. Factos que vêm ao encontro de dados atingidos por outros estudos como Carvalho *et al.* (2006) e Celada *et al.* (2011).

ENSAIO 2

Uma vez discutidos os resultados do Ensaio 1, nos quais conseguiu-se discernir que durante a primeira semana de alimentação exógena poderia ser benéfico, para a sobrevivência larvar e a homogeneização do crescimento, a inclusão de alimento inerte, nomeadamente alimento formulado/ração, foi desenhado e completado o Ensaio 2. A sobrevivência neste ensaio foi excelente nos três regimes alimentares, os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles (Figura 10 e Tabela 2).

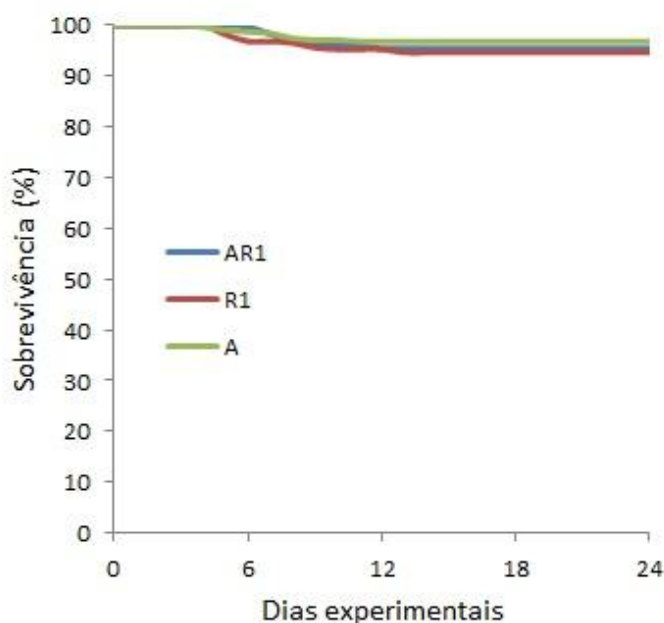


Figura 10. Sobrevivência diária durante o Ensaio 2, das larvas de peixe-zebra, em função do tratamento alimentar (A - náuplios de Artémia; R1 – ração durante a primeira semana e náuplios de Artémia durante as seguintes semanas; AR1 – náuplios de Artémia e ração durante a primeira semana, náuplios de Artémia durante as seguintes semanas;).

Em relação ao crescimento, observável na Figura 11, na Figura 12 e na Tabela 2, a uniformidade é relevante, de forma que também não há diferenças estatisticamente significativas com respeito ao comprimento total (CT) e ao peso (P).

Regime Alimentar Ensaio 2	A	AR1	R1
CT (mm)	12,2 ± 0,7	12,1 ± 0,3	11,1 ± 0,4
P (mg)	13,4 ± 2,3	14,0 ± 1,8	10,9 ± 1,1
CVCT (%)	16,7 ± 1,5	20,1 ± 5,8	18,9 ± 3,5
CVP (%)	47,8 ± 5,8	60,5 ± 14,5	51,8 ± 10,3
Sobrevivência final (%)	97 ± 2	95 ± 4	95 ± 2

Valores na mesma linha partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

Tabela 2 – Dados do Ensaio 2 de comprimento total (CT), peso (P), coeficiente de variação do comprimento total e do peso (CVCT e CVP) e sobrevivência das larvas de peixe-zebra (média ± desvio padrão).

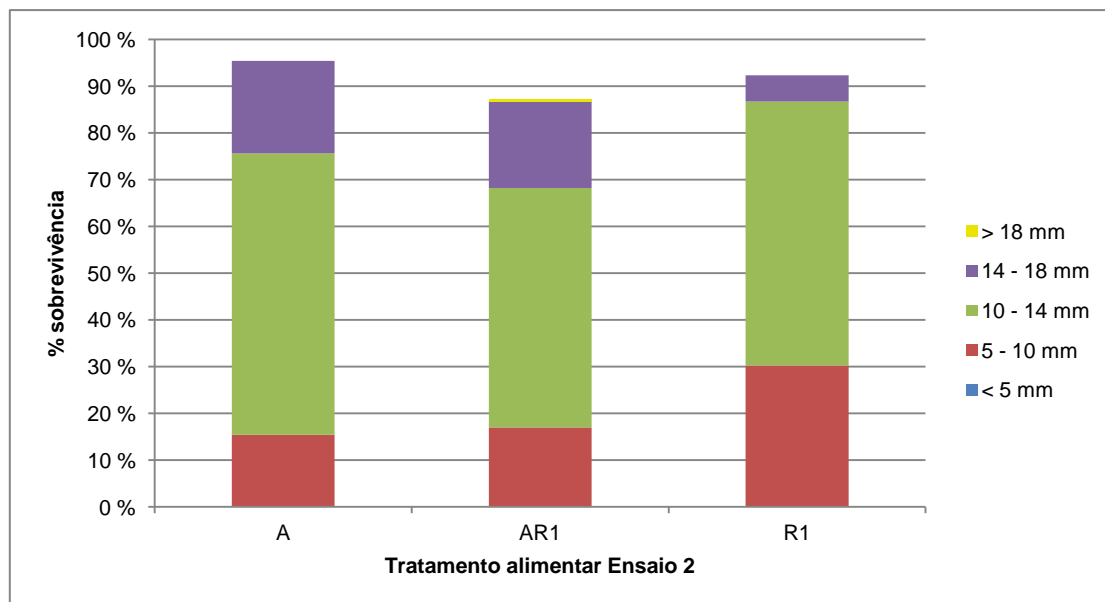


Figura 11. Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 2, com discriminação colorimétrica em função do tamanho.

Em consonância com os dados relatados, a homogeneidade entre as larvas, seja em relação ao CT, seja em relação ao P, também não foram encontradas diferenças significativas entre tamanhos (comparável nas Figuras 11 e 12).

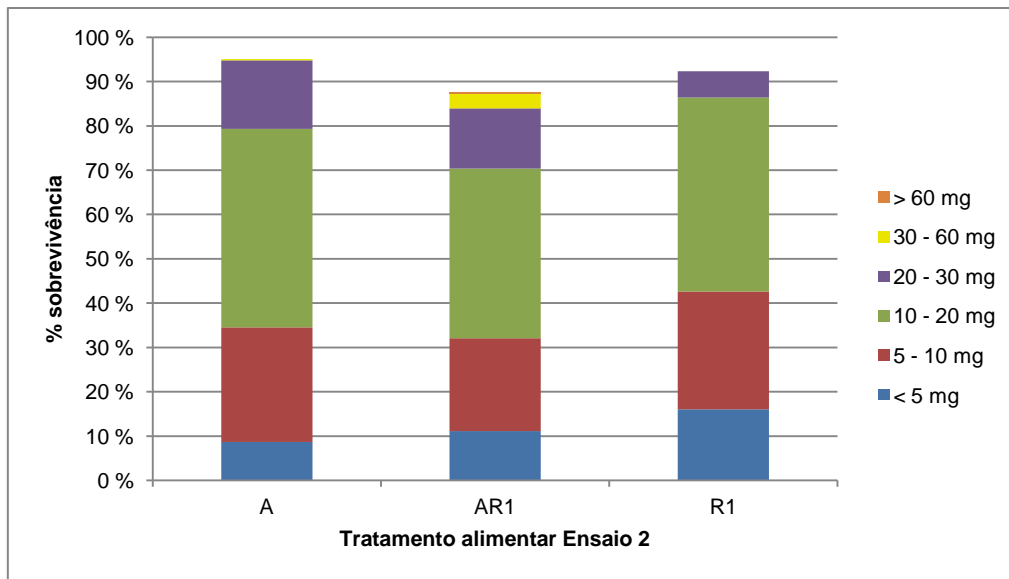


Figura 12. Gráfico da sobrevivência dos tratamentos alimentares do Ensaio 2, com discriminação colorimétrica em função do peso.

Em consequência destes factos podemos deduzir que, não havendo diferenças na sobrevivência nem na performance de crescimento entre os regimes alimentares aplicados, os náuplios de *Artémia* fornecidos durante a primeira semana poderão ser substituídos por alimento inerte, nomeadamente ração, sem que ocorra decréscimo nos fatores avaliados. O qual conduz a uma poupança nos meios e recursos utilizados face ao grupo alimentado sempre com náuplios, com resultados muito similares.

CONCLUSÕES GERAIS

Da realização, tratamento e estudo dos resultados de ambos ensaios pode-se concluir que:

- i) é possível e viável a cultura da fase larvar de peixe-zebra sem recurso exclusivo a presas vivas de nenhum tipo, em detrimento da sua performance de crescimento, embora com elevada sobrevivência;
- ii) é possível e viável a cultura da fase larvar de peixe-zebra sem recurso a ciliados que possam ter associadas outras culturas paralelas. Facto que permite alterar o esquema clássico de alimentação larvar, com benefícios económicos, técnicos e de recursos humanos, sem detrimento da performance de crescimento e/ou sobrevivência;
- iii) é perfeitamente possível e viável a cultura da fase larvar de peixe-zebra com recurso a alimentos formulados comercialmente, durante a primeira semana de alimentação exógena sem detrimento da sua performance de crescimento. Com favorecimento na menor utilização de recursos financeiros, técnicos e humanos.

BIBLIOGRAFIA

Best J., Adatto I., Cockington J., James A., Lawrence C., 2010. *A novel method for rearing first-feeding larval zebrafish: polyculture with Type L saltwater rotifers (Brachionus plicatilis)*. Zebrafish 7 (3): 289-295.

Carvalho A.P., Araújo L., Santos M.M., 2006. *Rearing zebrafish (Danio rerio) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance*. Aquaculture Research 37: 1107-1111.

Celada J.D., García V., Carral J.M., Sáez-Royuela M., González R., González Á., 2011. *Decapsulated Artemia cysts of different quality (high or low hatch-rate) as direct food for tench (Tinca tinca L.) larvae*. Aquaculture Research, doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03020.x.

Charlon N. & Bergot P., 1984. *Rearing system for feeding fish larvae on dry diets. Trial with carp (Cyprinus carpio L.) larvae*. Aquaculture 41: 1-9.

Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M., 2007. *Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field*. Zebrafish 4(1): 21-40.

Gerhard G.S., Kauffman E.J., Wang X., Stewart R., Moore J.L., Kasales C.J., Demidenko E., Cheng K.C., 2002. *Life spans and senescent phenotypes of zebrafish (Danio rerio)*. Experimental Gerontology 37: 1055-1068.

Gómez-Requeni P., Conceição L.E.C., Olderbakk Jordal A.E., Rønnestad I., 2010. *A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (Danio rerio) and changes in whole body proteome during development*. Fish Physiology and Biochemistry 36: 1199-1215.

Goolish E.M. & Okutake K., 1999. *Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface*. Journal of Fish Biology 55: 1054-1063.

Hensley M.R. & Leung Y.F., 2010. *A convenient dry feed for raising zebrafish larvae*. Zebrafish 7(2): 219-231.

Kaushik S., Georga I., Koumoundouros G., 2011. *Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements*. Zebrafish 8 (2): 87-95.

Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F., 1995. *Stages of embryonic development of the Zebrafish*. Developmental Dynamics 203: 253–310.

Lawrence, C., 2007. *The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review*. Aquaculture 269: 1–20.

Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer R.E., 2009. *Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish*. Developmental Dynamics, 238: 2975-3015.

Reed B. & Jennings M., 2010. *Guidance on the Housing and Care of Zebrafish*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA.

Sorgeloos P., Bossuyt E., Laviña E., Baesa-Mesa M., Persoone G., 1977. *Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture*. Aquaculture 12: 311-315.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C., 2008. *The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio**. Biological Reviews 83: 13-34.

Westerfield M., 1995. *The zebrafish book; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)*. University of Oregon Press, Eugene, OR.