

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**DIVERSIDADE BACTERIANA DO INTESTINO DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*), PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

Isabela Calegari Moia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle de Carla Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Maio – 2018**

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**DIVERSIDADE BACTERIANA DO INTESTINO DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*), PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

Isabela Calegari Moia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle de Carla Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo
Maio – 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

M712d

Moia, Isabela Calegari
Diversidade bacteriana do intestino de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) proveniente de diferentes regiões do Brasil / Isabela Calegari Moia. -- São Paulo, 2018.
v. 37f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientador: Leonardo Tachibana

1. Microbiota. 2. DGGE. 3. Peixe. 4. Ecologia microbiana. 5. Bactéria.
I. Tachibana, Leonardo. II. Título.

CDD 639.3.09

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

"DIVERSIDADE BACTERIANA ENCONTRADA EM INTESTINO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*), PROVENIENTE DE
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL"

AUTORA: Isabela Calegari Moia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Tachibana

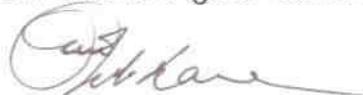
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Tachibana



Prof. Dr. Antenor Aguiar Santos



Prof. Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa

Data da realização: 05 de abril de 2018



Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Leonardo Tachibana

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais e irmãos por sempre me apoiarem e incentivarem a evoluir.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Tachibana e minha coorientadora Profa. Dra. Danielle de Carla Dias por concederem esta oportunidade e por todos os ensinamentos transmitidos durante este tempo, que me fizeram evoluir como profissional.

Aos amigos que fiz no Instituto de Pesca, pelos momentos de descontração, risadas e trocas de conhecimento. Em especial à Karen pelo companheirismo e garra durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Júlio Lombardi por quem conheci o Instituto de Pesca.

Ao Prof. Dr. Said Benhamed por me auxiliar nas análises da PCR quando estava com dificuldade.

À Profa. Dra. Maria Letizia Petesse, que despendeu toda tarde para me ajudar nas análises estatísticas.

Ao Ocimar Pedro, secretário da Pós-Graduação, pela paciência.

Aos funcionários Raquel e Seu Orlando pelas risadas e companheirismo com os alunos do laboratório.

A todos do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Málaga, na Espanha: Dr. Miguel Angel Moriñigo, Dra. María del Carmen Balebona, Dr. Eduardo Martínez Manzanares, Dr. Salvador Arijo e Dr. Alberto Medina por me recepcionarem muito bem, à Marta Domínguez Maqueda por me ajudar pacientemente a fazer os experimentos de DGGE, mas em especial à Dra. Silvana Teresa Tapia-Paniagua, à quem sou muito grata, que, mesmo longe, durante todo mestrado esteve presente, tirou as minhas dúvidas, me ajudou com a interpretação dos resultados e sempre foi muito prestativa e paciente.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante essa etapa, o meu agradecimento, muito obrigada.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Abreviaturas	iii
Resumo geral	iv
Abstract	v
Introdução geral	1
Objetivos	4
Referências bibliográficas	5
Capítulo 1	7
Artigo: Diversidade bacteriana encontrada em intestino de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus), proveniente de diferentes regiões do Brasil	8
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e métodos.....	11
Obtenção do intestino das tilápias.....	11
Extração de DNA e purificação.....	12
Análise por PCR-DGGE.....	13
Análise estatística.....	15
Resultados.....	16
Discussão.....	22
Conclusão.....	26
Agradecimentos.....	26
Conformidade com padrões éticos.....	26
Apêndice.....	27
Seção de material e métodos.....	27
Locais de coleta e intestino.....	27
Preparo do gel de poliacrilamida.....	29
Referências bibliográficas.....	32
Considerações finais	37

ABREVIATURAS

A ₂₆₀	Absorbância a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
APS	Persulfato de amônio
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNase	Desoxiribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
H'	Índice de diversidade de Shannon
J	Equitabilidade de Pielou
kb	Kilobase
NMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i>
PA	Cidade de Paulo Afonso
pb	Pares de bases
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCR quantitativo)
R	Riqueza de espécies
rDNA	DNA ribossomal (gene do ácido ribonucléico ribossomal)
RNAse	Ribonuclease
Rr	Habitabilidade
SFS	Cidade de Santa Fé do Sul
SIMPER	Porcentagem de similaridade (<i>Similarity Percentage</i>)
TAE	Tris-Acético-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TLD	Cidade de Toledo
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTOs	Unidades Taxonômicas Operacionais

RESUMO GERAL

A microbiota intestinal dos peixes apresenta grande influência na qualidade de vida destes animais. Uma composição microbiana bem estabelecida melhora as respostas imunológicas contra microrganismos patogênicos, além de conferir melhor digestão dos nutrientes. O objetivo do trabalho foi comparar a diversidade ecológica bacteriana obtida de intestinos de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), provenientes de distintas regiões do Brasil (sul, sudeste e nordeste) e relacionar com o ambiente e sistema de criação dos peixes. Para tanto, o intestino médio foi coletado em pisciculturas comerciais, nos municípios de Toledo - PR, Santa Fé do Sul – SP e Paulo Afonso – BA, totalizando 90 amostras intestinais. O DNA bacteriano, presente no intestino, foi extraído, purificado e amplificado por PCR. Os amplicons obtidos foram separados por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), resultando em um gel para as amostras de cada cidade. Os géis foram escaneados e analisados em software específico. A análise de agrupamento foi representada com a construção de um dendograma para se observar as distâncias entre as diferentes amostras. Parâmetros ecológicos foram calculados e comparou-se o índice de diversidade de Shannon, riqueza, habitabilidade e equitabilidade entre as amostras dos três géis. Observou-se no dendograma que a maioria das amostras coletadas em Toledo apresentaram apenas 7,7% de similaridade com a estrutura da comunidade microbiana intestinal dos peixes provenientes de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. As amostras provenientes de Paulo Afonso obtiveram maior índice de diversidade, sendo estatisticamente diferente daquelas de Toledo. O índice de habitabilidade das amostras de Toledo foi estatisticamente diferente das amostras de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. A riqueza não foi diferente estatisticamente ($P > 0,05$) entre as amostras obtidas das três cidades e para Paulo Afonso, Santa Fé do Sul e Toledo, foram encontrados, respectivamente, um total de 18, 22, 24 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Por último, a equitabilidade foi significativamente maior nas amostras obtidas em Paulo Afonso. Portanto, a microbiota intestinal se altera, dependendo do local e sistema (tanque-rede e viveiro escavado) em que as tilápias são cultivadas.

Palavras chave: Microbiota, DGGE, peixe, ecologia microbiana, bactéria.

ABSTRACT

The fish intestinal microbiota has a great influence on these animals quality of life. A well-established microbial composition improves immune responses against pathogenic microorganisms, as well as improving digestion of nutrients. This work aimed to compare the bacterial ecological diversity from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestines collected from different regions of Brazil (south, southeast and northeast) and its relationship to environment and raise system. Thus, the medium intestine, of 90 fish, was collected from different commercial farms, in Toledo - PR, Santa Fé do Sul - SP and Paulo Afonso – BA cities. DNA of all bacteria harboring in fish gut was extracted, purified and amplified by PCR. The obtained amplicons were separated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), resulting in a gel for the samples of each city. The gels were scanned and analyzed by specific software. The cluster analysis was represented by the construction of a dendrogram to observe the distances between the different samples. Ecological parameters were calculated and the Shannon diversity index, richness, habitability and equitability were compared between samples of the three gels. It was observed that the majority of samples collected in Toledo presented only 7.7% similarity in relation to fish intestinal bacteria community from Paulo Afonso and Santa Fé do Sul. Samples from Paulo Afonso showed higher ($P < 0.05$) diversity index, than Toledo. The habitability index from Toledo samples was statistically different from Paulo Afonso and Santa Fé do Sul. The richness did not present statistical difference ($P > 0.05$) between the three cities and for Paulo Afonso, Santa Fé do Sul and Toledo, were found, respectively, a total of 18, 22, 24 Operational Taxonomic Units (OTUs). Finally, the equitability of Paulo Afonso samples was significantly higher than other cities. Therefore, the intestinal microbiota changes, depending on the region (city) and system (net cage and excavated pond) in which tilapias are reared.

Key words: Microbiota, DGGE, fish, microbial ecology, bacteria.

INTRODUÇÃO GERAL

Na aquicultura, a microbiota intestinal não existe como uma entidade isolada, mas apresenta uma constante interação com o meio ambiente e é influenciada pelas condições de alimentação (NEDOLUHA; WESTHOFF, 1997; SCHIFFRIN; BLUM, 2002; EL-HAROUN *et al.*, 2006; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010; BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012; MCDONALD *et al.*, 2012; CARDA-DIEGUÉZ *et al.*, 2014; GIATSISS *et al.*, 2015; GIVENS *et al.*, 2015), sendo importante determinar a composição da microbiota dos peixes e, os efeitos dos diferentes fatores que podem alterá-la (TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010).

A gestão inadequada do manejo na aquicultura, pode causar estresse no peixe e ocasionar surtos de doenças (DEL'DUCA *et al.*, 2015). No caso da tilápia, a composição bacteriana do intestino é constituída também por patógenos facultativos, que em condições de estresse podem originar epizootias (AL-HARBI e UDDIN, 2004; 2005; DEL'DUCA *et al.*, 2015; MARCUSSO *et al.*, 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2016, a tilápia é a espécie mais criada no Brasil, representando 219,33 mil toneladas (45,4%) despescadas no país.

MARCUSSO *et al.* (2015) discorrem sobre infecções causadas pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). De acordo com estes autores, uma mudança na zona de conforto térmico destes peixes, pode facilitar a infecção por esta bactéria. Isso ocorre, pois afeta a homeostase, que requer estabilidade na composição da microbiota (SCHIFFRIN; BLUM, 2002).

A estabilidade da microbiota intestinal representa uma resistência natural às infecções causadas por microrganismos patogênicos (RINGO *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2010). O hospedeiro pode desencadear diferentes respostas aos patógenos, e estas apresentam especificidade, dependendo da espécie do microrganismo que coloniza seu trato digestivo (RAWLS *et al.*, 2004; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010).

Segundo SCHIFFRIN e BLUM (2002), existem dois mecanismos para estabilizar a microbiota intestinal: (i) interação bactéria-bactéria, que através da produção de ácidos graxos de cadeia curta, consumo de O₂ ou modificações no potencial redox, criam ecossistemas que são apropriados para alguns

gêneros de bactérias, mas hostil para outros. Adicionalmente, fatores como a produção de compostos antimicrobianos ou a competição pelos receptores na camada do muco intestinal são relevantes na colonização intestinal; (ii) interação hospedeiro-bactéria, que atua na regulação das funções intestinais e maturação do intestino. Dessa forma, a diversidade de bactérias desempenha um papel importante nos ecossistemas microbianos (TAPIA-PANIAGUA et al., 2010).

No intestino dos peixes, a microbiota intestinal pode apresentar diferentes funções de acordo com os hábitos alimentares destes animais (CLEMENTS et al., 2014; GIVENS et al., 2015). Por exemplo, CARDA-DIÉGUEZ et al. (2014) demonstraram que a composição da microbiota autóctone, presente no muco intestinal de robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, varia conforme a dieta. Porém, o gênero bacteriano mais representativo foi *Dysgonomonas*, envolvida na digestão de material vegetal, presente nas dietas testadas. PEDROTTI et al. (2015) relataram que um maior número de bactérias amilolíticas e celulolíticas estava presente no intestino da tilápia do que do jundiá, *Rhanda quelen*. Os autores concluíram que a alimentação, baseada em plantas e algas da tilápia, pôde influenciar nesta microbiota, em comparação com o jundiá, que é um onívoro oportunista.

Ainda, o funcionamento do sistema imunológico está relacionado com a microbiota intestinal. RAWLS et al. (2004) relataram a presença de genes envolvidos na imunidade inata do peixe-zebra, *Danio rerio* como resposta da microbiota intestinal. Segundo estes autores, a angiogenina, uma proteína antibiótica, é regulada pela microbiota intestinal neste peixe. Comentam ainda que, devido à ausência de uma resposta imune adaptativa até o estágio juvenil do peixe-zebra, a colonização de espécies bacterianas no intestino pode ser importante para manter a sua saúde durante esta fase da vida.

Portanto, monitorando a comunidade microbiana, é possível saber o quanto um parâmetro ambiental está modificando-a ao longo do tempo (FROMIN et al., 2002). O estado fisiológico, distúrbios e surtos de doenças podem ser melhor estudados a partir do conhecimento da microbiota intestinal (AL-HARBI e UDDIN, 2005; WU et al., 2010). Em termos epidemiológicos e ecológicos, é importante a investigação da microbiota intestinal de peixes para promover a sanidade aquícola (WELSH e McCLELLAND, 1990) e evitar

epizootias devido ao estresse (AL-HARBI e UDDIN, 2004; 2005; DEL'DUCA *et al.*, 2015; MARCUSSO *et al.*, 2015).

Neste contexto, estudou-se a ecologia microbiana presente no intestino de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), entre três diferentes regiões brasileiras: Sul, Sudeste e Nordeste. Segundo dados do IBGE 2016, a região Sudeste e Sul apresentaram um aumento da produção total de peixes de 12,7% e 13,1%, respectivamente, no ano de 2015. Toledo apresentou despesca de 5,80 mil toneladas de tilápia, permanecendo na quarta posição no ranking da produção deste peixe, seguida por Santa Fé do Sul (IBGE, 2016). O estado da Bahia produziu de 10 a 20 milhões de peixes, prevalecendo o cultivo de tilápias (IBGE, 2016). Dessa forma, os resultados gerados levam ao conhecimento da microbiota intestinal de tilápia-do-nilo em regiões representativas na produção deste peixe no Brasil.

OBJETIVO GERAL

Comparar a microbiota existente no intestino da tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) entre três diferentes cidades: Toledo – PR, Santa Fé do Sul – SP e Paulo Afonso – BA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar diversidade, riqueza, equitabilidade e habitabilidade da microbiota dos peixes com o sistema de criação;
- Verificar possíveis fatores que influenciam na abundância bacteriana da microbiota dos peixes provenientes de cada cidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HARBI, A. H. e UDDIN, M. N. 2004 Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, Amsterdam, 229(1-4): 37-44.
- AL-HARBI, A. H.; UDDIN, M. N. 2005 Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultures in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3-4): 566-572.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. 2012 Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2): 160-174.
- CARDA-DIEGUÉZ, M.; MIRA, A.; FOUZ, B. 2014 Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2): 451-459.
- CLEMENTS, K. D.; ANGERT, E. R.; MONTGOMERY, W. L.; CHOAT, J. H. 2014 Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Molecular Ecology*, 23(8): 1891-1898.
- DEL'DUCA, A.; CESAR, D. E.; ABREU, P. C. 2015 Bacterial community of pond's water, sediment and in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles characterized by fluorescent *in situ* hybridization technique. *Aquaculture Research*, 46: 707-715.
- EL-HAROON, E. R.; GODA, A. M. A. S.; CHOWDHURY, M. A. K. 2006 Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37: 1473-1480.
- FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. 2002 Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4(11): 634-643.
- GIATSI, C.; SIPKEMA, D.; SMIDT, H.; HEILIG, H.; BENVENUTI, G.; VERRETH, J.; VERDEGEM, M. 2015 The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5:18206.
- GIVENS, C. E.; RANSOM, B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. 2015 Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518: 209-223.

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2015. Rio de Janeiro: IBGE, 2016, v. 43, p. 1-49. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?indicador=1&id_pesquisa=21>. ISSN 0101-4234.
- MARCUSSO, P. F.; AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MELLO, H.; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. 2015 Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 52(1): 57-62.
- MCDONALD, R.; SCHREIER, H.; WATTS, J. 2012 Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *Plos One*, 7(10): p. e48018.
- NEDOLUHA, P C.; WESTHOFF, D. 1997 Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiology*, 14(3): 255-264.
- PEDROTTI, F. S.; DAVIES, S.; MERRIFIELD, D. L.; MARQUES, M. R. F.; FRAGA, A. P. M.; MOURIÑO, J. L. P.; FRACALOSI, D. M. 2015 The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46: 472-481.
- RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. 2004 Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13): 4596-4601.
- RINGO, E.; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T. M.; MYKLEBUST, R. 2003 Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 227(1-4): 395-415.
- SCHIFFRIN, E.; BLUM, S. 2002 Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 Suppl 3: S60-S64.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T.; CHABRILLÓN, M.; DÍAZ-ROSALES, P.; GARCÍA DE LA BANDA, I.; LOBO, C.; BALEBONA, M. C.; MORIÑIGO, M. A. 2010 Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2):310-9.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990 Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7213-7218.
- WU, S.; GAO, T.; ZHENG, Y.; WANG, W.; CHENG, Y.; WANG, G. 2010 Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1-4): 1-7.

CAPÍTULO 1

**DIVERSIDADE BACTERIANA DO INTESTINO DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*), PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

Artigo redigido nas normas da Revista “Aquaculture International”

QUALIS B1

Diversidade bacteriana do intestino de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), proveniente de diferentes regiões do Brasil

Isabela Calegari MOIA¹; Danielle de Carla DIAS ¹; Silvana Teresa TAPIA-PANIAGUA²; Marta Domínguez MAQUEDA²; Miguel Angel MORIÑO²;
Leonardo TACHIBANA¹

¹Instituto de Pesca – SAA/Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Pesca. Av. Francisco Matarazzo, 455, 05001-900, São Paulo, SP, Brasil.

²Group of Prophylaxis and Biocontrol of Fish Diseases, Department of Microbiology, University of Málaga, Spain.

RESUMO

A microbiota intestinal dos peixes apresenta grande influência na qualidade de vida destes animais. O objetivo do trabalho foi comparar a diversidade ecológica bacteriana obtida de intestinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), proveniente de distintas regiões do Brasil (Sul, Sudeste e Nordeste). O intestino médio foi coletado em pisciculturas comerciais, nos municípios de Toledo - PR, Santa Fé do Sul – SP e Paulo Afonso – BA, totalizando 90 amostras intestinais. O DNA bacteriano, presente no intestino, foi extraído, purificado e amplificado por PCR. Os amplicons obtidos foram separados por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), resultando em um gel para as amostras de cada cidade. As distâncias entre as diferentes amostras foi visualizada por um dendograma. Comparou-se o índice de diversidade de Shannon, riqueza, habitabilidade e equitabilidade entre as amostras dos três géis. As amostras coletadas em Toledo apresentaram baixa similaridade (7,7%) em relação às de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. As amostras provenientes de Paulo Afonso obtiveram maior índice de diversidade, sendo estatisticamente diferente das amostras obtidas dos peixes de Toledo. A habitabilidade das amostras de Toledo foi estatisticamente diferente de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. A riqueza não foi diferente estatisticamente ($P>0,05$) entre as três cidades e para Paulo Afonso, Santa Fé do Sul e Toledo, foram encontrados, respectivamente, um total de 18, 22 e 24 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Por último, a equitabilidade foi significativamente maior nos intestinos de peixes provenientes de Paulo Afonso. Portanto, a região e o sistema de criação de tilápias (tanque-rede e viveiro escavado) podem exercer uma influência na microbiota intestinal.

Palavras chave: Bactéria, DGGE, diversidade, ecologia microbiana, microbiota.

ABSTRACT

The fish intestinal microbiota has a great influence on these animals quality of life. The objective of this work was to compare the bacterial ecological diversity obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestines from different regions of Brazil (South, Southeast and Northeast). The medium intestine, of 90 fish, was collected from different commercial farms, in Toledo - PR, Santa Fé do Sul - SP and Paulo Afonso – BA cities. Bacteria DNA harboring in fish gut was extracted, purified and amplified by PCR. The obtained amplicons were separated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), resulting in a gel for the samples of each city. The distances between the different samples were observed by a dendrogram. The Shannon diversity index, richness, habitability and equitability were compared between the samples of the three gels. The samples collected in Toledo presented low similarity (7.7%) in relation to those collected in Paulo Afonso and Santa Fé do Sul. Samples from Paulo Afonso have had the higher diversity index, being statistically different from Toledo. Toledo samples habitability was statistically different from Paulo Afonso and Santa Fé do Sul. The richness did not present statistical difference ($P>0.05$) between the three cities and for Paulo Afonso, Santa Fé do Sul and Toledo, were found, respectively, a total of 18, 22 and 24 Operational Taxonomic Units (OTUs). Finally, the equitability of Paulo Afonso samples was significantly higher. Therefore, the region and the rearing system (net cage and excavated pond) may exert an influence on the intestinal microbiota.

Key words: Bacteria, DGGE, diversity, microbial ecology, microbiota.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é composta principalmente por bactérias (SPANGGAARD *et al.*, 2000; POND *et al.*, 2006), que colonizam o intestino logo após o nascimento ou incubação de diversos vertebrados (STEVENS e HUME, 1998; SCHIFFRIN e BLUM, 2002). Estudos recentes investigaram a microbiota intestinal de diferentes animais, pois esta não existe como uma entidade isolada, mas exerce distintas funções no hospedeiro e, pode fornecer informações de como o ambiente que o animal está inserido, está modulando sua composição (SCHIFFRIN e BLUM, 2002; EL-HAROON *et al.*, 2006).

Dentre as importantes funções da microbiota intestinal em peixes, podemos destacar a digestibilidade dos alimentos. De acordo com os diferentes hábitos alimentares, o intestino dos peixes pode ser colonizado por distintas espécies bacterianas (CLEMENTS *et al.*, 2014; GIVENS *et al.*, 2015; PEDROTTI *et al.*, 2015). SUGITA e ITO (2006) demonstraram que a maioria das bactérias intestinais de linguado, *Paralichthys olivaceus*, era do grupo *Vibrio scophthalmi-Vibrio ichthyoenteri* e da espécie *Vibrio fischeri*. Estas bactérias produzem quitinase, importante na digestão da quitina presente na fonte de alimento destes peixes. MCDONALD *et al.* (2012) relataram sobre a presença de bactérias intestinais capazes de degradar celulose, em cascudo panaque ou royal, *Panaque nigrolineatus*.

Outra função da microbiota intestinal é a proteção do hospedeiro contra patógenos. A colonização do intestino por um agente patogênico pode ser prevenida pelas interações entre o patógeno e a microbiota intestinal (MARTIN-ANTONIO *et al.*, 2007). Isso ocorre por meio de mecanismos de exclusão competitiva (GÓMEZ e BALCÁZAR, 2008). As bactérias endógenas competem por nutrientes e podem modular a expressão de genes no trato digestivo, criando um habitat favorável para si (BALCÁZAR *et al.*, 2006).

No caso da tilápia, a composição bacteriana do intestino é constituída também por patógenos facultativos. Por exemplo, AL-HARBI e UDDIN (2004) encontraram algumas bactérias intestinais que podem afetar tilápias mais severamente, como: *Streptococcus* sp., *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium* sp. DEL'DUCA *et al.* (2015), utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), identificaram que a espécie bacteriana mais

abundante no intestino de tilápias saudáveis, cultivadas em sistema semi-intensivo, foi *Pseudomonas fluorescens*. SAKATA *et al.* (1984) relataram que em tilápias doentes predominou-se este mesmo gênero bacteriano.

Devido às mudanças na composição bacteriana que podem ocorrer pelos fatores descritos acima, muitos trabalhos vem analisando a microbiota intestinal e técnicas mais avançadas têm sido desenvolvidas. A PCR-DGGE é uma técnica molecular que permite a análise da diversidade microbiana, presente em determinada amostra. Produtos da PCR podem ser separados de acordo com o comportamento de desnaturação do DNA, em função da quantidade e distribuição das bases G e C (MYERS *et al.*, 1985; FROMIN *et al.*, 2002). A técnica permite a análise simultânea de muitas amostras, advindas de diferentes ambientes e ajuda na compreensão de quanto a estrutura de uma comunidade microbiana pode ser afetada por qualquer alteração ambiental (FROMIN *et al.*, 2002).

Diante deste cenário, objetivou-se comparar a diversidade ecológica bacteriana de intestinos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Em seguida, relacionar riqueza (número de diferentes espécies na amostragem), equitabilidade (uniformidade das espécies), diversidade (combinação da riqueza e equitabilidade) e habitabilidade (o quanto um ambiente é habitável) de bactérias intestinais com o ambiente e sistema de criação dos peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do intestino das tilápias

Os exemplares de tilápias foram coletados em pisciculturas comerciais, nos municípios de Toledo – PR (TLD), no mês de dezembro de 2016, onde realiza-se a produção em viveiro escavado, com sete peixes por m², aeração constante e pouca renovação de água; Santa Fé do Sul – SP (SFS), no mês de agosto de 2016, localizadas no reservatório de Ilha Solteira (Rio Paraná), produção em sistema de tanques-rede (3,0 x 3,0 x 1,8 m), com 267 peixes por m³ e 40 kg/m³ de densidade de estocagem média final na fase 1; e Paulo Afonso – BA (PA), no mês de abril de 2016, localizadas nos reservatórios de

Moxotó e Itaparica (Rio São Francisco), produção em tanques-rede circular (3 m de diâmetro x 2 m de profundidade), com densidade média final de 120 kg/m³ de peixes na fase 1 (Figura S1 e S2). Estas cidades foram escolhidas por serem locais representativos na produção de tilápia no Brasil.

Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e Climatempo, a temperatura média do ar de Paulo Afonso e Toledo nos meses de coleta foram, respectivamente, 26,2°C e 23,4°C. Segundo o Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas da UNICAMP, Santa Fé do Sul apresentou temperatura média de 23,3°C, no mês de coleta.

Os peixes coletados em Toledo, Santa Fé do Sul e Paulo Afonso apresentavam peso médio de 75,5 g, 220,3 g e 238,4 g, respectivamente. Os mesmos foram anestesiados com eugenol (100 mg/L) e mortos por secção medular. Álcool 70% foi borrifado na superfície do peixe para descontaminação, coletado o intestino mediano (Figura S3), que foi transferido para criotubos de 2,0 mL e conservados em nitrogênio líquido. Em Paulo Afonso, onde não foi possível levar o botijão de nitrogênio, o intestino foi armazenado em 500 µL de RNA later[®]. No laboratório, os intestinos foram armazenados a -80°C.

2.2 Extração de DNA e purificação

Foram utilizadas 30 amostras intestinais por cidade, totalizando 90 amostras. Uma porção de 150 mg do intestino de cada amostra foi descongelada e macerada com um pistilo estéril. O DNA bacteriano foi extraído de acordo com a metodologia descrita por MARTÍNEZ *et al.* (1998), onde adicionou-se ao intestino macerado 300 µL de tampão de ressuspensão (Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,1M e NaCl 0,01M), 300 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,1M, NaCl 0,01M, SDS 1%) e 35 µL de proteinase K (150 mg/mL). As amostras foram incubadas a 55°C, por duas horas. Posteriormente, foi adicionado 190 µL de NaCl 6M, incubou-se em gelo por 10 min e centrifugou-se as amostras a 9.500 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se a mesma quantidade de isopropanol frio. As amostras foram centrifugadas a 9.500 g, por 10 min, a 4°C, descartado o sobrenadante e ao *pellet* obtido foi adicionado 500 µL de etanol

70% frio. Centrifugou-se novamente, a 9.500 g, por 5 minutos, a 4°C para que o DNA ressuspenso precipitasse. O sobrenadante foi descartado e deixou-se secar o *pellet* em temperatura ambiente. Ao DNA extraído adicionou-se 100 µL de água ultrapura, esterilizada e livre de DNAsas e RNAsas.

Foi realizada a confirmação visual da presença de DNA nas amostras, em eletroforese (100V por 35 minutos – tampão TBE 1x) em gel de agarose (1%, peso/volume), contendo corante Unisafe Dye (20.000X) e observação sob luz ultravioleta. Como padrão de peso molecular foi utilizado DNA ladder 1 kb (Uniscience). A concentração de DNA foi determinada a partir das medidas de absorbância, considerando o resultado da relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 como adequados.

Para seguir com a purificação das amostras, foi adicionado 1 µL da solução de RNase A (10 mg/mL em 0,01M de acetato de sódio) em 20 µL da solução de DNA extraído, e incubadas a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 µL de acetato de sódio 3M esterilizado (pH 5,2), 46 µL de isopropanol frio e incubou-se a -20°C, por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 9.500 g, por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com 500 µL de etanol 70% frio e centrifugado a 9.500 g, por 5 min. O etanol foi descartado e o *pellet* seco em temperatura ambiente. Adicionou-se de 40 µL a 200 µL de água ultrapura esterilizada e livre de DNAsas e RNAsas. A confirmação visual e a concentração de DNA purificado foram determinadas como descrito acima. As amostras de DNA foram diluídas até uma concentração de 20 a 100 ng/µL.

2.3 Análise por PCR-DGGE

A amplificação foi realizada por meio da técnica da PCR, utilizando o corante de detecção Sybr Green e *primers* 16S DNAr bacteriano, como utilizados nos trabalhos de STEINUM *et al.* (2009), TAPIA-PANIAGUA *et al.* (2011) e CERZUELA *et al.* (2012), com a seguinte sequência: 677R-GC (5'CGGGGCGGGGGCACGGGGGGATMTCTACGCATTTACCGCTAC-3') e 309-F (5'ACTCCTACGGGAGGCWGCAG-3'). A amplificação foi realizada em placa de 96 poços. Cada poço, com capacidade para 0,2 mL, continha 9 µL da amostra de DNA purificado e 11 µL da solução para PCR: 10 µL de 2x Sybr

Green supermix e 1 μL do mix de *primer* de concentração 10 μM . Os ciclos foram realizados em termociclador CFX96 Real Time System da seguinte forma: 1 ciclo de 95 °C durante 2 min, 38 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56°C durante 30 s, 68°C durante 30 s, e um ciclo final de 72°C durante 5 min. A confirmação dos amplicons obtidos foram analisadas por meio do CFX Manager software e gel de agarose 1% (100V por 35 minutos – tampão TBE 1x).

Os produtos da PCR obtidos foram separados por DGGE, utilizando o equipamento DCode TM System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, Figura S4). Um gel de 8% de poliacrilamida (37,5:1 bisacrilamida com dimensão de 18 cm x 18 cm x 0,01 cm) foi confeccionado, contendo um gradiente desnaturante de 30 a 55% de ureia e formamida em direção à eletroforese. A solução 100% desnaturante foi preparada com 7M ureia e 40% v/v de formamida deionizada (Tabela S1 e S2). Um total de 4 μL de produto da PCR e 2 μL de tampão de corrida foram aplicados nos poços do gel e submetidos à eletroforese durante 16 h, a 85V, em tampão TAE 0,5X (20mM Tris base, 10mM de ácido acético, 0,5mM de EDTA [pH 8,0]), a temperatura constante de 60°C. Os marcadores utilizados foram DNA ladder 1kb e 100 bp.

Os géis foram corados seguindo o protocolo de SANGUINETTI *et al.* (1994) com modificações. Primeiro foi preparada a solução fixadora Cairns' 8X (200 mL de etanol 96%, 10 mL de ácido acético e 40 mL de água ultrapura). O gel foi lavado com a solução fixadora Cairns' 1X (50 mL da solução Cairns' 8X e 350 mL de água ultrapura), por 3 min, sob agitação contínua. Foi retirada esta solução e adicionado nitrato de prata (0,4 g AgNO_3 em solução Cairns' 1X), por 10 min, sob agitação. Em seguida, lavou-se o gel com água ultrapura, por 2 min, descartou-se a água e adicionou-se uma solução reveladora (250 mL de 1,5% NaOH e 750 μL de formaldeído 37%), sob agitação, até aparecer as bandas. Se percebesse que ainda apareciam bandas, esta solução era descartada e adicionada uma nova para que as bandas mais fracas pudessem aparecer. Esta etapa durou de 15 a 20 min. Se não aparecessem mais bandas, o gel corado era digitalizado em escâner com resolução de 300 dpi. A análise da imagem do *fingerprinting* resultante foi feita no programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

2.4 Análise estatística

Uma matriz de semelhanças de curvas densitométricas dos padrões de bandas foi calculada utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson, que considera a localização das bandas e suas intensidades. O agrupamento dos padrões de bandas do DGGE foi representado com a construção de um dendograma como algoritmo de aglomeração, usando o *Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages* (UPGMA). Utilizando as intensidades das bandas, uma análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) foi realizada para se observar as distâncias entre as amostras representadas por pontos de diferentes cores para cada cidade de amostragem. Para verificar quais Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) eram os principais responsáveis pela diferença entre os três grupos de amostras, uma análise SIMPER foi utilizada (REES *et al.*, 2004; DIMITROGLOU *et al.*, 2010; FERGUSON *et al.*, 2010), a partir dos valores relativos das intensidades das bandas obtidos pela imagem do gel do DGGE (Figura 2).

Diferentes parâmetros ecológicos foram determinados: Índice de diversidade de Shannon, que mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido ao acaso de uma amostra (URAMOTO *et al.*, 2005). Este índice é representado pela fórmula: $H' = -\sum P_i \ln P_i$, onde P_i é definido como (n_i / N) , n_i é a intensidade de cada banda, e N é a soma das intensidades de todas as bandas (FROMIN *et al.*, 2002; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010; GIATSISS *et al.*, 2015). A riqueza de espécies, que representa o número de espécies existentes na amostra (URAMOTO *et al.*, 2005), baseando-se no número total de bandas, seguindo a fórmula $R = \sum b$ (TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2010; GIATSISS *et al.*, 2015). A equitabilidade, que representa a uniformidade de espécies e se estas possuem abundância semelhantes ou divergentes (MELO, 2008). É calculada segundo a fórmula $J = H'/H'_{\text{máx}}$, onde $H'_{\text{máx}}$ é definido como $\ln S$ e S é o número de espécies total na comunidade (GIATSISS *et al.*, 2015). A habitabilidade, que indica a capacidade do meio suportar o crescimento de diferentes espécies microbianas, ou seja o quanto é habitável, e está relacionada com a localização das bandas no DGGE (MARZORATI *et al.*, 2008). Estes autores

classificaram que valores acima de 30, correspondem a alta capacidade, enquanto que entre 10 e 30 e abaixo de 10 correspondem a média e baixa capacidade respectivamente. É calculada como o número total de bandas multiplicado pela porcentagem de gradiente desnaturante de ureia e formamida, seguindo a fórmula $R_r = N^2 \times D_g$, onde N é o número total de bandas de cada raia e D_g é o gradiente desnaturante compreendido entre a primeira e a última banda de cada raia (MARZORATI *et al.*, 2008). A abundância (número de indivíduos de cada espécie) se quantificou em função da intensidade das bandas de cada UTOs relativa a intensidade total das bandas do gel obtido a partir da análise da imagem. Diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros ecológicos foram analisadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sob nível de significância de 5%. As comparações entre os valores foram realizadas utilizando o teste de Dunn.

RESULTADOS

Os amplicons obtidos por PCR apresentaram um tamanho de 470 pb a 500 pb. O gel de agarose da PCR e de poliacrilamida (*fingerprinting*) corado encontram-se mostrado na Figura 1.

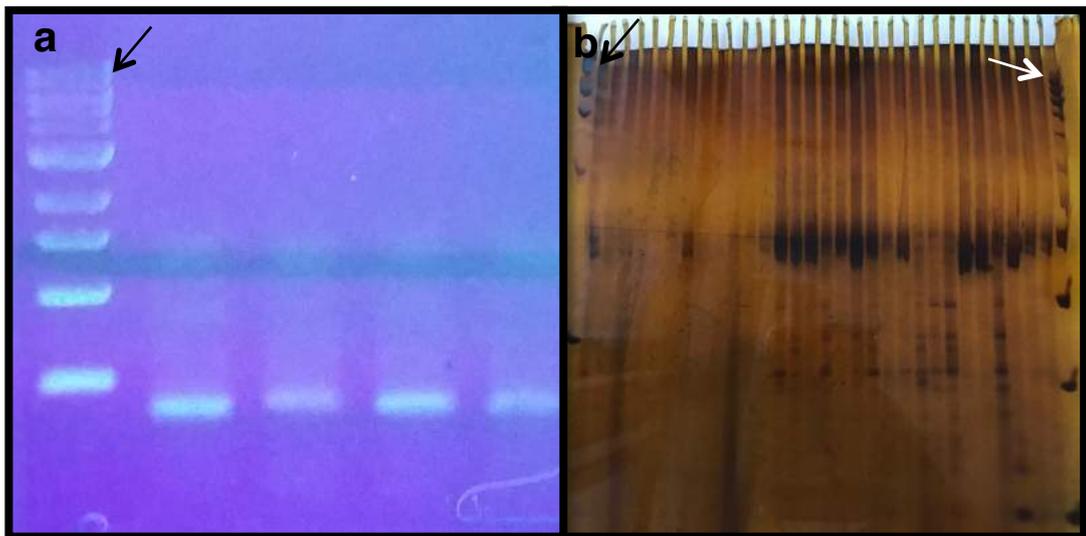


Figura 1 – (a) Gel de agarose mostrando tamanho dos amplicons obtidos por PCR. (b) Gel de poliacrilamida das amostras de Paulo Afonso,

corado com nitrato de prata. Setas pretas indicam marcador de 1 kb e seta branca indica marcador de 100 pb.

O gel do *fingerprinting* digitalizado da região V3 16S DNAr das bactérias intestinais das tilápias das três cidades estão mostrados na figura 2.

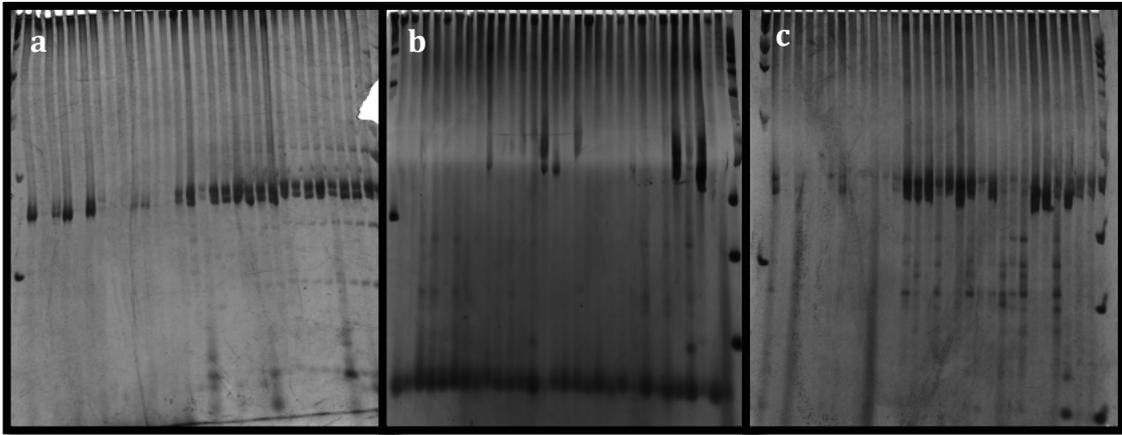


Figura 2 – *Fingerprinting* em gel de poliacrilamida representando a microbiota intestinal da tilápia nas três cidades: (a) Santa Fé do Sul, (b) Toledo e (c) Paulo Afonso.

A microbiota intestinal derivada da amostragem das três cidades pôde ser distribuída em um dendograma, baseado na análise de agrupamento dos padrões de bandas do DGGE (Figura 3).

A maioria dos ramos das amostras TLD, com exceção de TLD18 e TLD22, que estão mais acima no dendograma, estão agrupados próximos uns aos outros. Este grupo é apenas 7,7% semelhante ao resto das amostras PA e SFS, representadas pelos ramos verde e vermelho, respectivamente. As amostras PA e SFS encontram-se mais próximas e intercaladas entre elas. Não se observa destacadamente um agrupamento maior das amostras de bactérias de PA ou SFS, com porcentagem de similaridade pequena em comparação ao resto das amostras, como a maioria das amostras TLD.

Na análise NMDS, foi observado que as amostras TLD estão mais próximas entre elas, indicando que entre estes pontos existe uma maior similaridade do que quando se compara com a distribuição dos pontos das amostras PA e SFS. Uma maior dissimilaridade pode ser observada nos pontos destas duas amostras, que apesar de estarem próximos de TLD, existem outros pontos mais distribuídos no gráfico, indicando uma maior dissimilaridade entre eles (Figura 4).

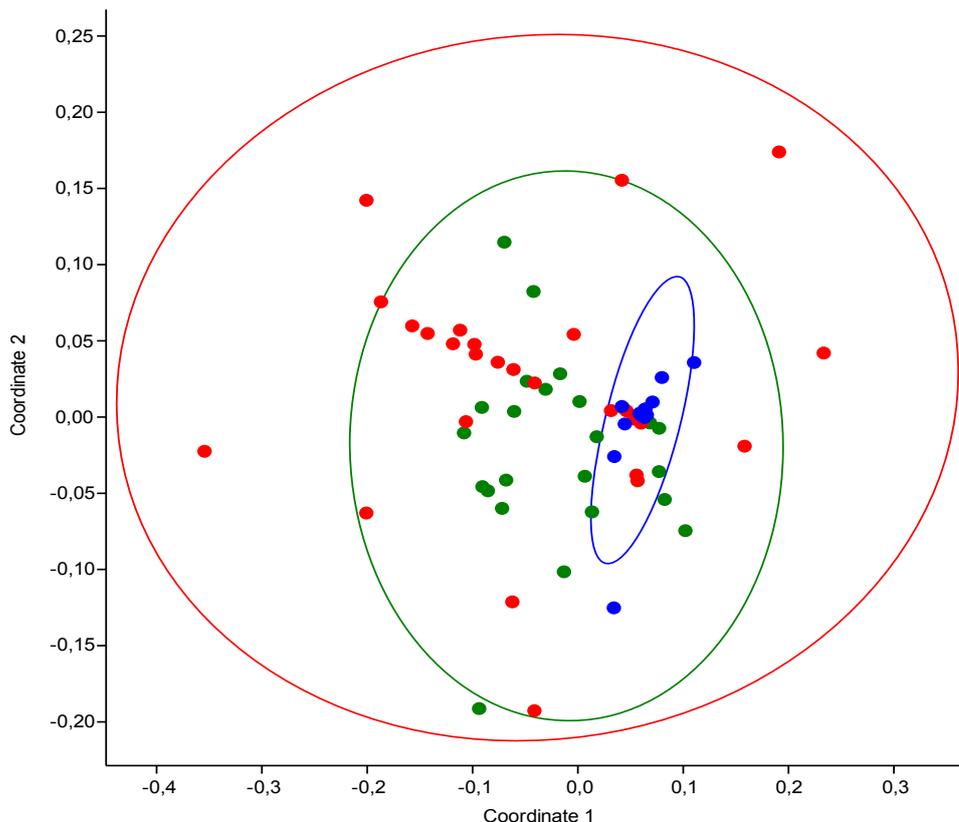


Figura 4 – Análise NMDS. Pontos em azul representam as amostras de Toledo, pontos em verde representam as amostras de Paulo Afonso e pontos em vermelho as amostras de Santa Fé do Sul.

As três principais UTOs que apresentaram maior contribuição para estas dissimilaridades entre as amostras estão listadas na Tabela 1. O resultado do teste SIMPER indica que as bandas de tamanho 445,44 pb são as que mais contribuíram para a diferenciação entre as três amostragens. Ou seja, é possível visualizar uma maior quantidade de bandas nesta posição nos géis das amostras de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul em comparação com o gel das amostras de Toledo.

Tabela 1 – Análise SIMPER com as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) em ordem decrescente de contribuição na diferenciação entre os três grupos de amostras.

UTOs	% Contribuição
445,44pb	23,71
382,99pb	22,7
396,27pb	11,74

Os valores dos parâmetros ecológicos encontram-se na figura 5. Uma maior taxa de diversidade encontra-se em Paulo Afonso e Santa Fé do Sul, que apresentaram diferenças significativas com relação a Toledo. A riqueza representada pelo número de UTOs, foi maior em Toledo. A equitabilidade foi maior em Paulo Afonso e estatisticamente ($P < 0,05$) diferente das outras cidades. Já a habitabilidade da microbiota intestinal dos peixes coletados em Paulo Afonso e Santa Fé do Sul foram as maiores e, estatisticamente diferente de Toledo. Porém os intestinos amostrados das três cidades demonstraram que apresentam baixa habitabilidade, segundo MARZORATI *et al.* (2008).

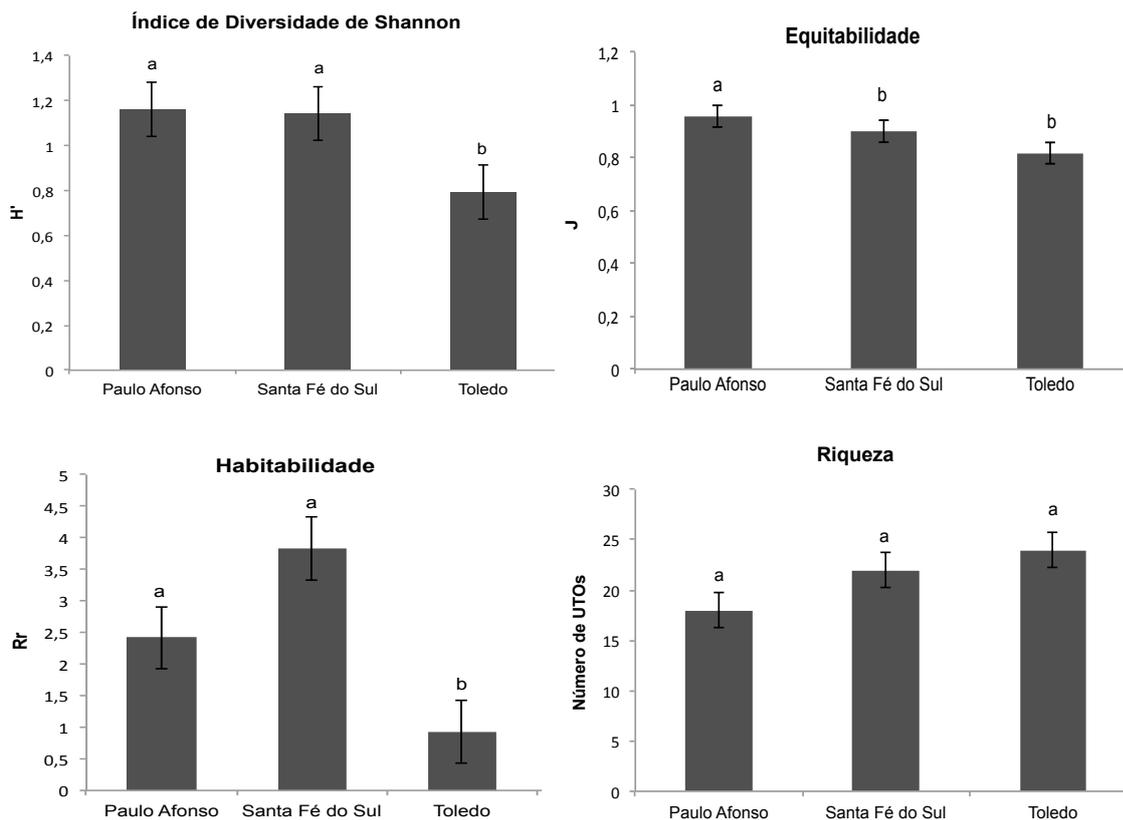


Figura 5 – Valores do Índice de Diversidade de Shannon (H'), equitabilidade (J), habitabilidade (Rr) e riqueza de espécies (R) da microbiota de amostras intestinais de tilápia dos três diferentes locais. Gráfico representando as médias mais erro padrão. Colunas seguidas por letras diferentes, em cada gráfico, apresentam diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Pode se perceber uma diferença na porcentagem de abundância de cada UTO representada (Tabela 2). Por exemplo, as bandas de tamanho 445,44 pb encontram-se em maior porcentagem nas amostras coletadas em Paulo Afonso, mas nas amostras coletadas em Toledo são a sexta maior e em Santa Fé do Sul a segunda maior. Assim como bandas na posição 222,04 pb e 520,13 pb em Paulo Afonso são a quarta e sexta de maior porcentagem, respectivamente, mas em Santa Fé do Sul e Toledo não encontram-se entre as seis primeiras. Em Santa Fé do Sul foram encontradas bandas de tamanho 629,37 pb não encontradas nas outras duas cidades, entre as seis primeiras de maior porcentagem. Toledo também apresentou bandas não encontradas entre as seis primeiras maiores nas outras duas cidades, como as de tamanho 354,52 pb e 346,37 pb. A abundância de indivíduos foi quantificada em função

da intensidade das bandas de cada UTOs relativa a intensidade total das bandas do gel obtido a partir da análise da imagem.

Tabela 2 – Porcentagem de abundância relativa de cada UTO determinada a partir da intensidade das bandas dos mesmos tamanhos em pares de bases.

Paulo Afonso		Santa Fé do Sul		Toledo	
UTOs	%	UTOs	%	UTOs	%
445,44pb	22,80	382,99pb	24,32	354,52pb	20,53
382,99pb	21,98	445,44pb	23,75	346,37pb	10,69
396,27pb	12,77	396,27pb	7,52	396,27pb	9,99
222,04pb	7,96	367,24pb	6,52	382,99pb	8,49
367,24pb	7,26	212,72pb	5,67	367,24pb	6,02
520,13pb	5,03	629,37pb	5,25	445,44pb	5,69

DISCUSSÃO

O estudo dos parâmetros ecológicos exerce um importante papel para entender o funcionamento da microbiota intestinal de peixes. A técnica da PCR-DGGE tem se tornado uma grande aliada na análise de toda comunidade bacteriana, apresentando um potencial em termos de interpretações ecológicas e estatísticas (FROMIN *et al.*, 2002).

Os intestinos coletados em Toledo eram advindos de tilápias cultivadas em viveiro escavado e em regime semi-intensivo. Enquanto que as pisciculturas de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul eram constituídas por tanques-rede em regime intensivo. O sistema tanque-rede apresenta um tipo diferente de ambiente, composto por estruturas flutuantes, revestidas por telas, situadas em represas ou reservatórios. Enquanto que no sistema viveiro escavado há a presença de solo, maior quantidade de matéria orgânica e material vegetal. O ambiente circundante pode influenciar na microbiota intestinal dos peixes (GANGULY e PRASAD, 2012). AL-HISNAWI *et al.* (2016)

demonstraram que a mucosa intestinal do peixe *Liopropoma santi*, abrigava as mesmas espécies bacterianas da água do rio onde viviam. DEL'DUCA *et al.* (2015) encontraram espécies semelhantes na água do viveiro e no intestino de tilápia-do-nilo. AL-HARBI e UDDIN (2005) encontraram sete bactérias em comum entre o intestino da tilápia-do-nilo, sedimento e a água do viveiro. Dessa forma, diferentes sistemas podem apresentar diferentes tipos de microrganismos exercendo influência na microbiota.

Além disso, isto pode ser corroborado com o dendograma da análise de agrupamento, onde há uma separação das amostras de Toledo, apresentando 7,7% de similaridade com as amostras de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. O mesmo ocorreu no trabalho de DEHLER *et al.* (2016), onde amostras intestinais de salmão de dois diferentes ambientes (gaiolas e aquário de recirculação) também apresentaram dois diferentes grupos (um para cada sistema). Ainda, GIATSIIS *et al.* (2015), demonstraram que entre dois sistemas diferentes a porcentagem de similaridade das espécies bacterianas diminuía em comparação com dois sistemas iguais. Isso ocorreu devido a abundância de espécies que se alterava conforme o tempo e o tipo de sistema. Neste trabalho também podemos observar diferenças nas porcentagens de abundância de cada UTO e, algumas delas, estavam presentes nas amostras de Toledo, mas não estavam nas de Paulo Afonso e Santa Fé do Sul.

O resultado da análise NMDS evidencia a similaridade existente entre as amostras de Toledo, que quando observada no dendograma apresentam 41,5% (entre TLD25B e TLD46) de similaridade, enquanto que o resto das amostras apresentam 24,9% de similaridade. O agrupamento das amostras de Toledo foi mostrada claramente, tanto no plano NMDS como no dendograma UPGMA.

Outro fator que pode modular a microbiota intestinal é a temperatura, como relatado por HORSLEY (1977). A temperatura pode aumentar ou diminuir a quantidade de bactérias. NEDOLUHA e WESTHOFF (1997) demonstraram que os gêneros bacterianos isolados dos intestinos de *Morone saxatilis* eram diferentes conforme a alteração da temperatura de incubação. Em 35°C e 22°C o número de bactérias encontradas foi significativamente maior do que na temperatura de 7°C. RESENDE *et al.* (2013) relatou uma maior abundância bacteriana na água de cultivo de tilápia-do-nilo em períodos mais quentes. AL-

HARBI e UDDIN (2004) relataram que a microbiota intestinal de tilápias híbridas foi mais abundante em temperaturas mais quentes e algumas bactérias estão presentes sazonalmente, como *Photobacterium damselae*, *Pasteurella* sp., *Cellulomonas* sp. e *Bacillus* sp. Outras bactérias foram isoladas somente em temperaturas mais frias, como *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Flavobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. MOLINARI *et al.* (2003) relataram que *Plesiomonas shigelloides* é um patógeno comum em regiões tropicais e raro em regiões temperadas.

Corroborando com os resultados destes autores, no presente trabalho também podemos observar alterações na porcentagem de abundância de cada UTO, entre as três cidades. Paulo Afonso, onde a temperatura média foi maior, apresentou abundância maior que Toledo e equitabilidade significativamente maior que as outras duas cidades. Segundo o INMET, esta cidade está localizada em uma região em que há baixa amplitude térmica e maior uniformidade da temperatura. Estas características aceleram o crescimento da maioria dos microrganismos. A medida que a temperatura aumenta, há um aumento das atividades metabólicas do microrganismo (MADIGAN *et al.*, 2010). Sabe-se que o ambiente pode influenciar a microbiota intestinal dos peixes. Sendo assim, se a temperatura da água é maior, conseqüentemente, a microbiota intestinal pode ser mais diversa.

Apesar da riqueza não ter sido estatisticamente diferente entre os intestinos coletados nas diferentes cidades, Toledo apresentou um maior número de UTOs, comparado com Paulo Afonso e Santa Fé do Sul. A composição da alimentação pode influenciar na microbiota intestinal e em diferentes regimes a alimentação pode ser diferente. Como em Toledo era criação em viveiro escavado e regime semi-intensivo, a dieta era composta por ração e alimento natural (plâncton, bentos perifiton e insetos), diferentemente dos peixes criados regime intensivo encontrado em Santa Fé do Sul e Paulo Afonso que recebiam somente ração e muito pouco alimento natural.

MARTIN-ANTONIO *et al.* (2007) demonstraram que entre diferentes regimes com dietas diferentes, a microbiota intestinal de linguado pode ser alterada. No regime extensivo, seguiram alimentação natural, a base de poliquetas e crustáceos. No regime semi-extensivo, os peixes foram inicialmente alimentados com poliquetas selvagens e três meses depois com

uma dieta comercial. Houve uma predominância do gênero *Vibrio*, sendo mais abundante no intestino de peixes cultivados no regime semi-extensivo. No regime intensivo, composto por três dietas (comercial, comercial seguida de jejum de uma semana e com poliquetas), o gênero *Vibrio* apresentou uma maior porcentagem na dieta comercial (85% a 99%). Já os peixes alimentados com poliquetas, apresentaram em sua microbiota intestinal, a porcentagem de 51,7% a 85,9% desta bactéria. Além disso, na dieta, onde os peixes foram mais alimentados com poliquetas, observou-se maior abundância do gênero *Shewanella*.

A diversidade é uma combinação da riqueza e equitabilidade, que representa a uniformidade da abundância de espécies (MELO, 2008). Paulo Afonso apresentou um valor significativamente maior para a equitabilidade, fazendo com que o resultado do seu índice de diversidade de Shannon fosse maior. Por apresentar temperaturas mais altas, pode ter influenciado no resultado da diversidade.

Por último, a habitabilidade em Paulo Afonso e Santa Fé do Sul foi significativamente maior. Possivelmente, este resultado foi devido ao tipo de sistema de criação (tanque-rede) e ao regime intensivo, onde foram coletadas as amostras destas cidades, fatores que diferenciam das amostras coletadas na cidade de Toledo (sistema viveiro escavado e regime semi-intensivo). Como discutido anteriormente, o ambiente pode exercer influência na microbiota intestinal, conseqüentemente alterando, também, este parâmetro ecológico.

Dessa forma, muitos fatores podem afetar diretamente na composição de comunidades bacterianas nos intestinos dos peixes. O sistema em que são cultivados, a dieta e temperatura apresentam influência na ecologia da microbiota intestinal. Sistemas e locais muito diferentes podem apresentar uma microbiota diferente.

Com o estudo da microbiota e suas interações é possível estabelecer estratégias para modular a microbiota intestinal com a utilização de produtos como probióticos, prébióticos, ácidos orgânicos e, conseqüentemente, melhorar a prevenção de doenças e reduzir a mortalidade dos peixes.

CONCLUSÃO

A microbiota intestinal é modulada por fatores ambientais característicos de cada cidade.

O sistema de produção altera os parâmetros ecológicos analisados e separou as amostras provenientes de Toledo em um grupo.

Sistemas de criação dos peixes iguais demonstraram abrigar, nos intestinos dos peixes cultivados, espécies semelhantes (UTOs de mesmo tamanho). Enquanto que, entre sistemas diferentes (tanque-rede e viveiro escavado), os parâmetros ecológicos foram alterados (abundância, diversidade e habitabilidade).

A temperatura onde os peixes são cultivados alterara a abundância bacteriana, e, conseqüentemente, aumenta os índices de diversidade e equitabilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores prestam seus agradecimentos à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento deste projeto (processo 2014/15390-1).

CONFORMIDADE COM PADRÕES ÉTICOS

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Pesca e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

APÊNDICE

1. Seção de material e métodos

1.1. Locais de coleta e intestino



Figura S1 – Mapa do Brasil. BA, SP e PR representam, respectivamente, os estados Bahia, São Paulo e Paraná. Setas indicam as cidades de coleta.



Figura S2 – Locais de coleta. Associação Mulheres Guerreiras do Sítio Umurama, Reservatório de Itaparica e Reservatório de Moxotó pertencem à cidade de Paulo Afonso. Represa de Ilha Solteira pertence à cidade de Santa Fé do Sul. Círculo em vermelho indica a cidade de Toledo, onde o sistema era viveiro escavado.

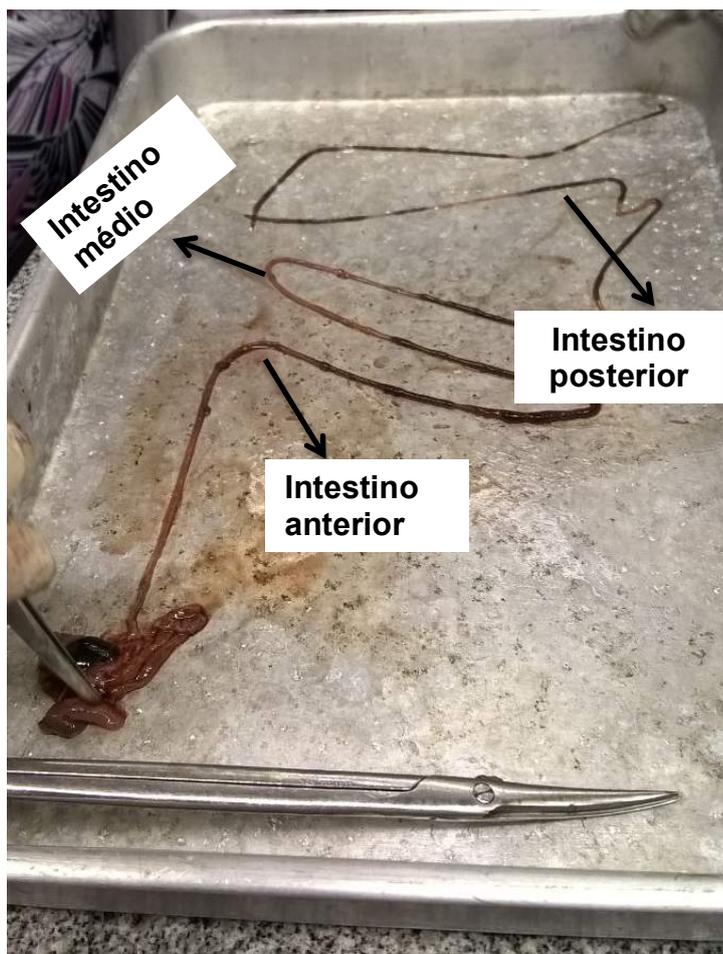


Figura S3 – Porções intestinais de tilápia-do-nylo.

1.2. Preparo do gel de poliacrilamida

Para o gel de 8% de poliacrilamida primeiro preparou-se as soluções estoque abaixo:

Tabela S1 – Soluções estoque utilizadas na preparação do gel de poliacrilamida para DGGE.

Solução 100% denaturante

200 ml	40% acrylamida/bisacrylamida 37.5:1 (BioRad)
400 ml	Formamida deionizada
10 ml	Tampão T.A.E. 50x
20 ml	Glicerol
421.6 g	Urea

Solução 0% denaturante

200 ml	40% acrylamida/bisacrylamida 37.5:1 (BioRad)
10 ml	Tampão T.A.E. 50x
20 ml	Glicerol

Tampão T.A.E. 50x

242 g	TRIS
57,1 ml	Ácido acético glacial
100 ml	0.5 M EDTA [pH 8.0]

Cuidadosamente a solução 100% foi aquecida e agitada para que a urea dissolvesse. As soluções 0% e 100% foram ajustadas para o volume final de 1 L com água ultrapura e armazenadas em temperatura ambiente, no escuro.

Em seguida, com as placas de vidro montadas e encaixadas no suporte para a confecção do gel, preparou-se a solução “plug” (1,5 mL solução 0% denaturante, 4,5 µL de TEMED, 15 µL de APS 10% [p/v]). Esta deve ser colocada primeiro e serve para vedar o espaço entre as placas de vidro, fazendo com que o gel não escorra antes de solidificar. Posteriormente, foi preparado e colocado o gradiente do gel, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela S2 – Volume de cada reagente que deve ser preparado, de acordo com o gradiente escolhido.

Gradiente	0%	100%	Volume final	TEMED	10% APS
<i>%</i>	<i>ml</i>	<i>ml</i>	<i>ml</i>	<i>µl</i>	<i>µl</i>
0	9	-	9	13	50
30	9,1	3,9	13	13	50
31	8,97	4,03	13	13	50
32	8,84	4,16	13	13	50
33	8,71	4,29	13	13	50
34	8,58	4,42	13	13	50
35	8,45	4,55	13	13	50
36	8,32	4,68	13	13	50
37	8,19	4,81	13	13	50
38	8,06	4,94	13	13	50
39	7,93	5,07	13	13	50
40	7,8	5,2	13	13	50
41	7,67	5,33	13	13	50
42	7,54	5,46	13	13	50
43	7,41	5,59	13	13	50
44	7,28	5,72	13	13	50
45	7,15	5,85	13	13	50
46	7,02	5,98	13	13	50
47	6,89	6,11	13	13	50
48	7,76	6,24	13	13	50
49	6,63	6,37	13	13	50
50	6,5	6,5	13	13	50
51	6,37	6,63	13	13	50

52	6,24	6,76	13	13	50
53	6,11	6,89	13	13	50
54	5,98	7,02	13	13	50
55	5,85	7,15	13	13	50
56	5,72	7,28	13	13	50
57	5,59	7,41	13	13	50
58	5,46	7,54	13	13	50
59	5,33	7,67	13	13	50
60	5,2	7,8	13	13	50

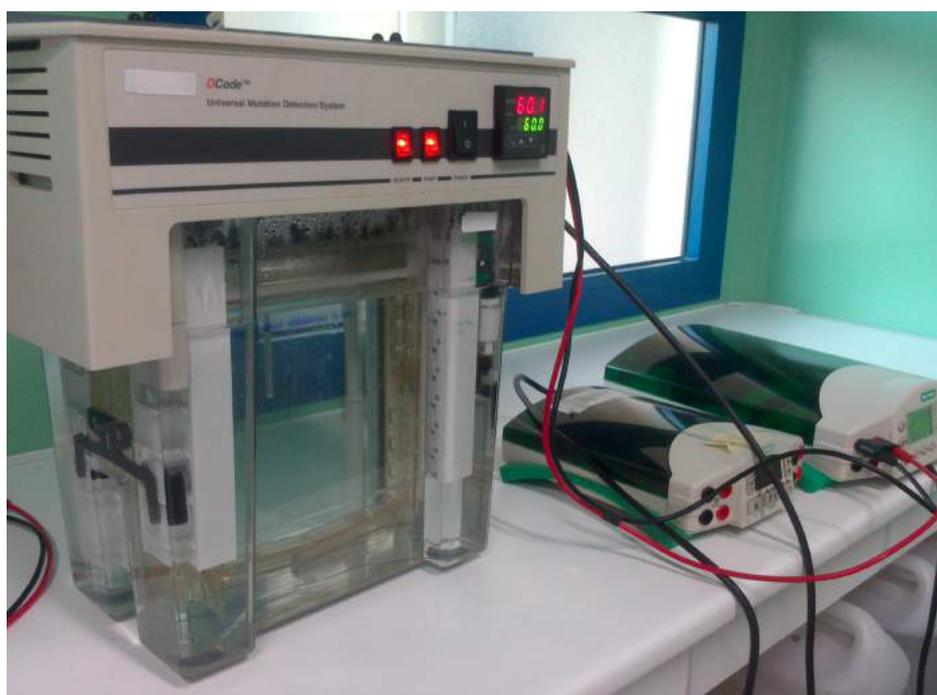


Figura S4 – DCode™ System. Equipamento utilizado para eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HARBI, A. H. e UDDIN, M. N. 2004 Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, Amsterdam, 229(1-4): 37-44.
- AL-HARBI, A. H.; UDDIN, M. N. 2005 Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultures in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3-4): 566-572.
- AL-HISNAWI, A. A.; MUSTAFA, J. M.; YASSER, Y. K.; HUSSAIN, K. A.; JABUR, A. M. 2016 Influence of aquatic environment on microbiota of *Liopropoma santi* fish in a local river in Iraq. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2: 41-45.
- BALCÁZAR J.L.; DE BLAS I.; RUIZ-ZARZUELA I.; CUNNINGHAM D.; VENDRELL D.; MUZQUIZ J.L. 2006 The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173–186.
- CEPAGRI Metereologia Unicamp. Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em: < http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_524.html> Acesso em 31 jan. 2018.
- CEREZUELA, R.; FUMENAL, M.; TAPIA-PANIAGUA, S. T.; MESEGUER, J.; MORIÑIGO, M. A.; ESTEBAN, M. A. 2012 Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*, 350(3): 477-489.
- CLEMENTS, K. D.; ANGERT, E. R.; MONTGOMERY, W. L.; CHOAT, J. H. 2014 Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Molecular Ecology*, 23(8): 1891-1898.
- Climatempo. Climatologia Toledo. Disponível em: < <https://www.climatempo.com.br/climatologia/1336/toledo-pr>> Acesso em 31 ja. 2018.
- DEHLER, C. E.; SECOMBES, C. J.; MARTIN, S. A. M. 2016 Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467: 149-157.
- DEL'DUCA, A.; CESAR, D. E.; ABREU, P. C. 2015 Bacterial community of pond's water, sediment and in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles characterized by fluorescent *in situ* hybridization technique. *Aquaculture Research*, 46: 707-715.
- DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D. L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S. J. 2010 Effects of mannan oligosaccharide (MOS)

supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300: 182-188.

EL-HAROON, E. R.; GODA, A. M. A. S.; CHOWDHURY, M. A. K. 2006 Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), *Aquaculture Research*, 37: 1473-1480.

FERGUSON, R. M. W.; MERRIFIELD, D. L.; HARPER, G. M.; RAWLING, M. D.; MUSTAFA, S.; PICCHIETTI, S.; BALCÁZAR, J. L.; DAVIES, S. J. 2010 The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* 109(3):851-862.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. 2002 Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4(11): 634-643.

GANGULY, S.; PRASAD, A. 2012 Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22:11-16.

GIATSI, C.; SIPKEMA, D.; SMIDT, H.; HEILIG, H.; BENVENUTI, G.; VERRETH, J.; VERDEGEM, M. 2015 The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5:18206.

GIVENS, C. E.; RANSOM, B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. 2015 Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518: 209-223.

GÓMEZ, G. D.; BALCÁZAR, J. L. 2008 A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2): 145-154.

HORSELEY, R. W. 1977 A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *Journal of Fish Biology*, 10: 529-553.

Instituto Nacional de Meteorologia. Normas Climatológicas do Brasil 1961-1990. Disponível em: <
<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisclimatologicas>>
Acesso em 31 ja. 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. 2010 Crescimento microbiano. In:____. Microbiologia de Brock. Porto Alegre: Artmed. p. 141-174.

- MARTIN-ANTONIO, B.; MANCHADO, M.; INFANTE, C.; ZEROLO, R.; LABELLA, A.; ALONSO, C.; BORREGO, J. J. 2007 Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*, 38: 1213-1222.
- MARTÍNEZ, G.; SHAW, E. M.; CARRILO, M.; ZANUY, S. 1998 Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24(2):238-239.
- MARZORATI M.; WITTEBOLLE, L.; BOON, N.; DAFFONCHIO, D.; VERSTRAETE, W. 2008 How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10:1571-1581.
- MCDONALD, R.; SCHREIER, H.; WATTS, J. 2012 Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *Plos One*, 7(10): p. e48018.
- MELO, A. S. 2008 O que ganhamos confundindo riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade?, *Biota Neotropica*, 8(3)21-27.
- MOLINARI, L. M.; SCOARIS, D. O.; PEDROSO, R. B.; BITTENCOURT, N. L. R.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. A. A.; FILHO, B. P. D. 2003 Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 25(2): 267-271.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. 1985 Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acid Research*, 13(9): 3131-3145.
- NEDOLUHA, P C.; WESTHOFF, D. 1997 Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiology*, 14(3): 255-264.
- PEDROTTI, F. S.; DAVIES, S.; MERRIFIELD, D. L.; MARQUES, M. R. F.; FRAGA, A. P. M.; MOURIÑO, J. L. P.; FRACALOSSO, D. M. 2015 The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46: 472-481.
- POND, M. J.; STONE, D. M.; ALDERMAN, D. J. 2006 Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261: 194–203.
- REES, G. N.; BALDWIN, D. S.; WATSON, G. O.; PERRYMAN, S.; NIELSEN, D. L. 2004 Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length

- polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 339–347.
- RESENDE, J. A.; SILVA, V. L.; CESAR, D. E. DEL’DUCA, A.; FONTES, C. O.; DINIZ, C. G. 2013 Seasonal dynamics of microbial community in an aquaculture system for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 46(5): 1233-1240.
- SAKATA, T.; UNO, K.; KAKIMOTO, D. 1984 Dominant bacteria of the aerobic microflora in tilapia intestine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50(3): 489-493.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS, N. E.; SIMPSON, A. J. 1994 Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 914-921.
- SCHIFFRIN, E.; BLUM, S. 2002 Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 Suppl 3: S60-S64.
- SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; NIELSEN, T.; APPEL, K.F.; GRAM, L. 2000 The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, 182: 1–15.
- STEINUM, T.; SJASTAD, K.; FALK, K.; KVELLESTAD, A.; COLQUHOUN, D. J. 2009 An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture*, 293(3/4): 172-179.
- STEVENS, C. E.; HUME, I. D. 1998 Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, 78(2): 393-426.
- SUGITA, H.; ITO, Y. 2006 Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Letters in Applied Microbiology*, 43(3): 336-342.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T.; CHABRILLÓN, M.; DÍAZ-ROSALES, P.; GARCÍA DE LA BANDA, I.; LOBO, C.; BALEBONA, M. C.; MORIÑIGO, M. A. 2010 Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2):310-9.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T.; REYES-BECERRIL, M.; ASCENCIO-VALLE, F.; ESTEBAN, M. A.; CLAVIJO, E.; BALEBONA, M. C.; MORIÑIGO, M. A. 2011 Modulation of the intestinal microbiota and immune system of farmed *Sparus aurata* by the administration of the yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in conjunction with inulin. *Aquaculture Research & Development*, S1:012.
- URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. 2005 Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera:

Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. *Neotropical Entomology*, 34(1): 033-039.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho procuramos caracterizar a microbiota intestinal presente em intestinos de tilápia-do-nilo. Conseguimos obter resultados significativos e perceber que existem diferenças na ecologia bacteriana, quando se compara as três cidades brasileiras. É possível confirmar que a microbiota não é uma unidade isolada e estática, mas é perturbada devido a muitos fatores, como alimentação, temperatura e sistema de criação.

O resultado da análise de agrupamento permite visualizar como sistemas de criação diferentes podem modular a microbiota intestinal, pois as amostras intestinais coletadas em viveiro escavado foram colocadas em um grupo separado das amostras coletadas em tanque-rede. O resultado da abundância bacteriana das amostras intestinais coletadas em Paulo Afonso corrobora com diversos autores de que a abundância aumenta conforme o aumento da temperatura, tornando a equitabilidade maior. Além disso, pudemos encontrar diferenças significativas na diversidade bacteriana, equitabilidade e habitabilidade, sendo as duas primeiras maiores em Paulo Afonso e a segunda maior em Santa Fé do Sul.

A técnica da PCR-DGGE se mostrou eficiente na análise da comunidade bacteriana, permitindo realizar interpretações ecológicas, estatísticas e caracterizar a estrutura da microbiota intestinal. Portanto, os métodos utilizados neste trabalho e os resultados gerados podem ser úteis para produtores que desejam conhecer a comunidade bacteriana presente em sua produção, a fim de estabelecer estratégias de como melhorar a saúde dos animais cultivados.