



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Microbiota intestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*) e
tilápia (*Oreochromis niloticus*) alimentados
com diferentes fontes de carboidrato.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Débora Machado Fracalossi
Co-orientadora: Maude Regina de Borba

Fabiola Santiago Pedrotti

Florianópolis – SC
2011

**Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina**

P372m Pedrotti, Fabiola Santiago
Microbiota intestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*) e
tilápia
(*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes
fontes de carboidrato [dissertação] / Fabiola
Santiago Pedrotti;
orientadora, Débora Machado Fracalossi. -
Florianópolis, SC,
2011.
61 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Jundiá (Peixe). 3. Tilápia
(Peixe).
4. Microbiota. 5. Bactérias. 6. Enzimas. 7. Dietas.
I.
Fracalossi, Débora Machado. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Microbiota intestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*) e
tilápia (*Oreochromis niloticus*) alimentados
com diferentes fontes de carboidrato.**

Por

FABÍOLA SANTIAGO PEDROTTI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*

Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

Dr. Maurício Laterça Martins

*Em memória ao meu
querido amigo e colega Leonardo
Matsunaga Yamaguti.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Enio Pedrotti e Alina Santiago, e meus irmãos Gabri e Rapha, pelo amor e apoio incondicionais.

À professora Débora Machado Fracalossi pelos valiosos ensinamentos, motivação e orientação.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), Departamento de Aquicultura.

Ao professor Alcir Luiz Dafré, pelo apoio ao intercambio acadêmico com a Universidade de Plymouth (UoP), UK.

Ao Carlito Klunk pela paciência e prestatividade.

À professora Maria Risoleta Marques e Ana Paula de Medeiros Fraga, pelo auxílio nas análises de extração de DNA; e José Luiz Mouriño, pelas discussões.

Ao professor Simon Davies e Daniel Merrifield, da Universidade de Plymouth, pela oportunidade concedida e orientação das análises moleculares realizadas no Laboratório de Microbiologia (UoP).

Aos queridos amigos e colegas pelo companheirismo nesta trajetória: Maria do Carmo Gominho Rosa, Ana Paula Oeda, Dariane Schoffen, Gisele Speck, Norha Bolivar, Jhon Jimenez, Vitor Giatti e Ricardo Berto.

Pela amizade Weber, Nessa, Dani, Vicente, Pawlick, Pancho, Nanda, Fe, Emílio, Alemão, Maris, Karine, Robs, Márcia, Jaque, Morena, Thaís, Ju, Monique, Aline, Luisa, Suelen, Bruninho, Clá, Lyza e Matheus.

RESUMO

A microbiota intestinal de jundiá *Rhamdia quelen* e tilápia *Oreochromis niloticus* foi comparada. Foram observadas bactérias capazes de digerir os macro nutrientes (proteína, lipídios e carboidratos) presentes nas dietas, estando, em geral, em maiores números na tilápia. A distribuição de grupos bacterianos variou ao longo do trato intestinal, sendo diferente entre as espécies estudadas. O jundiá apresentou maior crescimento de bactérias proteolíticas e lipolíticas na porção posterior, onde também ambas espécies tinham mais bactérias amilolíticas. Pode haver maior degradação de amido por enzimas exógenas provenientes da microbiota na porção final do intestino, o que aumentaria a disponibilidade deste nutriente para o hospedeiro. Comparou-se também a microbiota intestinal entre as duas espécies, após a administração de dietas contendo milho, trigo, mandioca, arroz ou dextrina. Os jundiás alimentados com dieta contendo arroz apresentaram mais bactérias totais. Por outro lado, quando mandioca ou milho foi utilizado, bactérias amilolíticas foram mais presentes em tilápia. A microbiota da parede intestinal dos peixes foi sensível a dieta administrada, que alterou sua composição. *Fusobacterium* foi detectada em jundiás alimentados com dietas contendo arroz, e contendo mandioca, dextrina, arroz e milho para tilápia. Foi evidenciada diferenciação da microbiota de jundiá e tilápia, já que foram observadas apenas no primeiro, bactérias do grupo das Spirochaetales, comuns nos tratamentos com milho, mandioca e dextrina. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da microbiota intestinal na digestão de carboidratos em peixes, associando-se técnicas bacteriológicas convencionais com moleculares.

Palavras-chave: Jundiá, tilápia, microbiota, bactéria, amilolítica, dieta.

ABSTRACT

Intestinal bacterial microbiota of jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*)

The bacterial population of the intestinal tract of jundia *Rhamdia quelen* and tilapia *Oreochromis niloticus* were compared. Bacteria in both species could digest the dietary macronutrients (protein, lipid and carbohydrate), and were generally present in higher numbers in tilapia. The distribution of the bacterial groups varied along the intestinal tract and differed between species. Jundia showed higher growth of proteolytic bacteria and lipid in the distal portion, where both species also had more amylolytic bacteria. Thus, there may be higher starch degradation by exogenous enzymes in the final intestinal portion, which could increase energy availability to the host. The intestinal microbiota between the two species was also compared after administration of diets containing corn, wheat, manioc, rice or dextrin. Jundia fed rice presented higher counts of total bacteria. On the other hand, when manioc and corn were used as carbohydrate sources, the population of amylolytic bacteria was higher in tilapia. The bacterial microbiota present in the intestinal tissue of fish was sensitive to the diet, which changed its composition. *Fusobacterium* was detected in jundia fed diets containing rice, and manioc, dextrin, rice, and corn for tilapia. The microbial differentiation was demonstrated between jundia and tilapia, since Spirochaetales were observed only in the first one, common in the treatments with corn, manioc and dextrin. Additional studies are required for a better understanding of the intestinal microbiota and its role in carbohydrates digestion in fish. Such studies should associate molecular and conventional bacteriological techniques.

Keywords: Jundia, tilapia, microbiota, bacteria, amylolytic, diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Imagem negativa de eletroforese em gel gradiente desnaturante, corado com *Sybr Green*, da amplificação de 16S rRNA de bactéria por PCR. Padrões de bandas representam digitais das populações bacterianas presentes na parede intestinal de peixes. Cada coluna é composta do *pool* de seis tilápias (de 1 a 5) ou jundiás (de 6 a 10), alimentados com dietas experimentais contendo 30% de mandioca (1), trigo (2), dextrina (3), arroz (4), milho (5), milho (6), trigo (7), arroz (8), mandioca (9) e dextrina (10) 39

LISTA DE TABELAS

- Tabela I. Formulação e composição proximal da dieta basal utilizada no segundo ensaio33
- Tabela II. Valores médios (\pm desvio padrão) das contagens [$\log(x+1)$ de UFC g^{-1}] de bactérias celulolíticas, proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas e totais das porções intestinais anterior, média e posterior, entre tilápia e jundiá alimentados com ração comercial (ensaio 1).....37
- Tabela III. Valores médios (\pm desvio padrão) entre as contagens [$\log(x+1)$ de UFC g^{-1}] de bactérias amilolíticas e totais entre a porção intestinal posterior de tilápia e jundiá após 15 dias de alimentação com dietas contendo diferentes fontes de carboidrato (ensaio 2).....38

SUMARIO

INTRODUÇÃO	15
Carboidrato na nutrição de peixes	15
Microbiota intestinal de peixes	16
Microbiota e nutrição	17
Enzimas bacterianas	18
Técnicas moleculares x técnicas tradicionais	19
O jundiá e a tilápia	21
JUSTIFICATIVA.....	24
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
Microbiota de jundiá <i>Rhamdia quelen</i> e tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> e carboidrato dietético	26
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Peixes e condições experimentais	30
Avaliação bacteriológica do trato intestinal	32
Meios de cultura.....	34
Identificação molecular da população microbiana.....	34
Análise estatística.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO.....	39
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS	44
CONCLUSÕES.....	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	51

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal dos peixes compreende um complexo ecossistema microbiano, composto principalmente por bactérias, que está envolvido na nutrição e imunidade do hospedeiro. Considerando os avanços de estudos com mamíferos, pouco é conhecido sobre o estabelecimento, diversidade e função das comunidades bacterianas em peixes (NAYAK, 2010).

A composição de sua microbiota está relacionada com a água, dieta e ambiente de criação, como observado por Ringo *et al.* (2006b) em bacalhau (*Gadus morhua*), quando alimentado com fontes protéicas vegetal ou animal. A carga bacteriana total dos peixes é baixa quando comparada a animais endotérmicos, e varia com a idade, nutrição e ambiente (GOMEZ e BALCAZAR, 2008).

A microbiota intestinal pode contribuir com a digestão e absorção de nutrientes, produzindo vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos e enzimas digestivas (SUGITA *et al.*, 1990; CLEMENTS, 1997; SKRODNYTÉ-ARBAEIAUSKIENÉ *et al.*, 2006). Após detecção da produção exógena de enzimas digestivas no trato intestinal de diferentes espécies de teleósteos, Bairagi *et al.* (2002) sugerem o isolamento de cepas bacterianas produtoras no desenvolvimento de probióticos e formulação de rações para aquicultura. Neste mesmo estudo, foi observada significativa população de bactérias amilolíticas no trato dos peixes avaliados, resultado relevante considerando que o amido é um importante nutriente na alimentação de peixes de água doce, como carpa e tilápia (TAKEUCHI, 1991).

Carboidrato na nutrição de peixes

No ambiente natural aquático, onde fontes de carboidrato são relativamente escassas, os sistemas digestório e metabólico dos peixes se adaptaram para utilizar proteína e lipídio como fonte energética (WALTON e COWEY, 1982). Entretanto, algumas espécies de peixe utilizam o carboidrato contido no alimento mais eficientemente do que outras. Esta é uma característica que diferencia seus hábitos alimentares: em geral, as espécies onívoras e herbívoras utilizam melhor o carboidrato que aquelas carnívoras (HEMRE *et al.*, 1993, 1995; JANTRAROTAI *et al.*, 1998). Entre espécies tropicais e de águas temperadas também há diferença na utilização de carboidratos, sendo as primeiras mais eficientes (WILSON, 1994). De acordo com Krogdahl *et al.* (2005), as diferenças na capacidade de utilização do carboidrato entre as espécies de peixes são reflexos da diversidade anatômica e funcional

do trato digestório e órgãos associados. As funções digestórias capazes de hidrolisar uma maior variedade de itens alimentares contendo carboidratos são mais desenvolvidas em peixes herbívoros e onívoros, quando comparadas com os carnívoros.

Peixes carnívoros apresentam intestino relativamente curto, e conseqüentemente, menor atividade da α -amilase que peixes onívoros (RUST, 2002). Um curto tempo de trânsito intestinal restringe a capacidade de hidrólise enzimática, causando limitada digestão e absorção dos carboidratos complexos (HEROLD *et al.*, 1995). A capacidade de peixes onívoros na utilização de maiores concentrações de carboidrato na dieta se deve à maior atividade da amilase no trato digestório (HIDALGO *et al.*, 1999), bem como ao maior número e afinidade de receptores de insulina (PÁRRIZAS *et al.*, 1994a,b).

A atividade da amilase no trato digestório foi relacionada à composição da dieta, principalmente quanto à inclusão de carboidratos: à medida que esta aumenta, ocorre aumento da atividade da amilase. Este padrão de resposta foi encontrado para vários teleósteos, como o carnívoro pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (LUNDSTEDT *et al.*, 2004), larvas de robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 1994; PÉRES *et al.*, 1996), pós-larvas de linguado *Solea senegalensis* (RIBEIRO *et al.*, 2002) e juvenis do onívoro jundiá (MELO, 2004).

Microbiota intestinal de peixes

Estudos comprovam a colonização do trato digestório de peixes por um grande número de bactérias heterotróficas (TRUST *et al.*, 1979; CAHILL, 1990; SAKATA, 1990; SUGITA *et al.*, 1997; HANSEN e OLAFSEN, 1999). Bactérias Gram negativas parecem dominar o intestino de peixes, contudo a presença de Gram positivas também é comum, incluindo diferentes espécies de ácido lácticas (RINGO e GATESOUBE, 1998). Em geral, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. e espécies de *Flavobacterium/Cytophaga* são organismos mais frequentes no trato de peixes de água doce, enquanto no trato de peixes marinhos, *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Enterobacteriaceae* prevalecem (RINGO e BIRKBECK, 1999).

A microbiota intestinal dos peixes é influenciada pela dieta, sendo específica e composta por bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e obrigatórias (RINGO *et al.*, 1995; 2006a; RINGO e OLSEN, 1999). É altamente dependente da colonização bacteriana durante os estádios iniciais de desenvolvimento do peixe, variando com as condições às quais está submetido (OLAFSEN, 2001; RINGO e

BIRKBECK, 1999; RINGO *et al.*, 2006b). No trato intestinal de peixes de água doce, Hagi *et al.* (2004) descreveram alterações sazonais na comunidade de bactérias ácido lácticas; Lésel e Péringer (1981) demonstraram a influência da temperatura na microbiota bacteriana de truta arco-íris.

Pelo efeito simbiótico da microbiota no hospedeiro, é importante conhecer a influência dos promotores de crescimento, largamente utilizados na aquicultura no controle de enfermidades (McPHEARSON *et al.*, 1991). He *et al.* (2010), utilizando técnicas de quantificação e identificação moleculares, demonstraram que a microbiota intestinal autóctone de tilápia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*) é modulada pela administração de antibióticos. Observou-se redução da diversidade bacteriana, bem como da intensidade de alguns grupos de bactérias a níveis não detectáveis.

São relatadas importantes funções da microbiota em peixes, afetando nutrição e a saúde do hospedeiro (BURR *et al.*, 2005). O trato gastrointestinal é uma das principais vias de infecção em peixes (RINGO *et al.*, 2007) e sua anatomia afeta diretamente sua comunidade microbiológica (HEIKKINEN *et al.*, 2006). De acordo com revisão realizada por Ringo *et al.* (2010), probióticos inibem os efeitos de bactérias patogênicas pela produção de compostos bactericidas e por competir com patógenos para aderência no epitélio intestinal. Também regulam respostas imunes e favorecem a homeostase do epitélio intestinal, via promoção da sobrevivência celular e respostas de proteção. Entretanto, ainda se desconhece como o gradual desenvolvimento do trato gastrointestinal durante o crescimento do peixe está associado às infecções e se existe um padrão diferenciado entre as espécies.

Segundo Heikkinen *et al.* (2006), geralmente o número de bactérias totais presentes é maior que 10^6 UFC g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por grama) (RINGO e OLSEN, 1999) e muitos gêneros típicos de animais endotérmicos como *Bifidobacteria*, *Bacteroides*, *Eubacterium* (ISOLAURI *et al.*, 2004) são raros ou ausentes. Bactérias ácido-lácticas são comuns, mas em menor número (RINGO *et al.*, 2000), enquanto *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Vibrio* estão frequentemente presentes (SUGITA *et al.*, 1996; RINGO e OLSEN, 1999; HUBER *et al.*, 2004).

Microbiota e nutrição

Estudos com animais terrestres, inclusive humanos, têm focado na regulação da microbiota intestinal a fim de conferir efeitos favoráveis

para o organismo hospedeiro, como aumento do crescimento, digestão, imunidade e resistência a doenças (BURR *et al.*, 2005).

Nutricionalmente, a microbiota pode estar associada a uma maior eficiência na digestão do alimento ingerido ou mesmo à síntese de nutrientes como vitaminas (RINGO e BIRKBECK, 1999).

Segundo Clements (1997), bactérias anaeróbias podem contribuir com a nutrição de peixes através da suplementação de ácidos graxos voláteis. Ainda, de acordo com Nayak (2010), a síntese de diferentes vitaminas e aminoácidos por bactérias gastrointestinais aeróbias, anaeróbias e aeróbias facultativas é relatada em peixes como carpa comum (*Cyprinus carpio*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Em garoupa (*Epinephelus malabaricus*), Lin *et al.* (2010) demonstraram a produção de cianocobalamina por bactérias colonizadoras do trato intestinal em quantidades suficientes para suprir a exigência da espécie.

Em ensaio alimentar realizado por Ringo *et al.* (2008) com salmão do Atlântico (*Salmo salar*) foi demonstrada a sensibilidade da composição da microbiota autóctone e alóctone para alterações dietéticas. Os peixes foram alimentados por 28 dias com dietas suplementadas com celulose ou polissacarídeos não amiláceos de soja. As bactérias heterotróficas presentes no intestino foram estudadas por meio de técnicas bacteriológicas tradicionais, sendo a população residente observada através de microscopia eletrônica de transmissão.

Após avaliar o efeito do farelo de soja no desempenho, histopatologia e microbiota intestinal de truta arco-íris, Heikkinen *et al.* (2006) sugerem o uso de preparações bacterianas isoladas capazes de colonizar o trato para ajustar os peixes a novos ingredientes, como a soja. Seria uma nova aplicação probiótica, já que foi observada resposta da dieta na população bacteriana. Mais estudos para a compreensão da composição da microbiota cultivável e não cultivável devem ser realizados a fim de averiguar os mecanismos de alteração e até onde estes refletem a adaptação da microbiota a diferentes dietas. Os peixes, porém, apresentam grande variação individual na composição da microbiota ou entre tanques, mesmo sob mesmos tratamentos, o que evidencia a dificuldade em generalizar a diversidade de populações das amostras.

Enzimas bacterianas

Autores concordam que a estrutura intestinal dos peixes fornece condições ecológicas favoráveis para diversos grupos de microbiota. Bactérias intestinais residentes, que poderiam ser importantes para a

digestão, podem produzir enzimas extracelulares que auxiliam o processo de decomposição alimentar (MINAMI *et al.*, 1972; STICKNEY e SHUMWAY, 1974; LESEL *et al.*, 1986; KONO *et al.*, 1987; RIMER e WIEBE, 1987; CAHILL, 1990; SUGITA *et al.*, 1997). Neste caso, tais bactérias têm atividade enzimática relacionada ao substrato degradado.

A microbiota bacteriana do trato gastrointestinal de peixes representa um importante e diversificado potencial enzimático, o qual pode interferir consideravelmente em grande parte do metabolismo do animal hospedeiro. Apesar da disponibilidade de informação sobre a microbiota intestinal de organismos endotérmicos, bem como sobre sua função no processo digestório, pouco se tem conhecimento a respeito da população bacteriana no trato gastrointestinal de ectotérmicos (BAIRAGI *et al.*, 2002). Portanto, são limitados os estudos sobre fontes microbianas de enzimas digestivas no trato digestório de peixes. Alguns trabalhos, contudo, citam a produção microbiana de celulase no trato gastrointestinal destes animais (STICKNEY e SHUMWAY, 1974; PREJS e BLASZCYK, 1977; LINDSAY e HARRIS, 1980; LESEL *et al.*, 1986; DAS e TRIPATHI, 1991; SAHA e RAY, 1998).

Alguns estudos relatam o isolamento de cepas de bactérias com atividade enzimática para celulose e amido a partir do intestino de teleósteos de água doce (BAIRAGI *et al.*, 2002; SAHA *et al.*, 2006). Sugita *et al.* (1997), investigando a microbiota intestinal de espécies comerciais de peixes de água doce, isolaram cepas bacterianas responsáveis pela produção de altas concentrações de amilase no intestino, o que demonstra a importância da enzima produzida pela microbiota na digestão de amido para os peixes.

Skrodenytė-Arbaciauskienė (2007) quantificou cepas com atividade proteolítica e amilolítica nas porções anterior, média e posterior do trato intestinal, demonstrando maiores contagens na porção média do ciprinídeo *Rutilus rutilus*. As maiores produções enzimáticas foram obtidas por cepas pertencentes ao gênero *Aeromonas*, cujas espécies bacterianas são também as mais comumente isoladas em peixes de água doce. Os resultados encontrados confirmaram, novamente, a importância da produção extracelular de enzimas por bactérias intestinais na digestão dos principais ingredientes de dietas formuladas.

Técnicas moleculares x técnicas tradicionais

Tradicionalmente, técnicas bacteriológicas convencionais são utilizadas no estudo da microbiota intestinal de peixes, incluindo crescimento em meios seletivos e não seletivos, isolamento e

caracterização fenotípica. Contudo, métodos moleculares baseados em PCR e seqüenciamento do rDNA 16S estão sendo cada vez mais aplicados no campo da ecologia microbiana (HOVDA *et al.*, 2007). Segundo Pond *et al.* (2006), estas técnicas permitem a avaliação de comunidades complexas e a determinação de populações dominantes a partir de produtos amplificados de DNA.

Segundo Muyzer *et al.* (1993), técnicas biológicas moleculares permitem novas abordagens para a análise da estrutura e composição de espécies em comunidades microbianas. A variação na seqüência de rRNA pode ser explorada para inferir relações filogenéticas entre microorganismos (WOESE, 1987) e desenvolvimento de provas de nucleotídeos para a detecção da taxa individual microbiana em habitat natural (AMANN *et al.*, 1992; GIOVANNONI *et al.*, 1990). Da mesma forma, também podem ser aplicadas para a determinação da diversidade de comunidades microbianas e identificação de vários microorganismos não cultiváveis (GIOVANNONI *et al.*, 1990; WARD *et al.*, 1990).

Com a extração de DNA de um grupo bacteriano, pode-se identificar a diversidade genética das populações dominantes por “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” (DGGE) (MUYZER *et al.*, 1993). O procedimento é baseado na eletroforese de fragmentos de rDNA 16S amplificados por cadeia de reação polimerase (PCR) em gel de poliacrilamida contendo concentração linear crescente de desnaturantes. Pela mobilidade eletroforética, os fragmentos, de mesmo tamanho, mas com pares de bases distintos, podem ser separados efetivamente pela DGGE, já que a variação na seqüência dos fragmentos interrompe a migração em diferentes posições no gel (LERMAN *et al.*, 1984).

Em salmão do Atlântico, Hovda *et al.* (2007) averiguaram bactérias presentes no intestino anterior, médio e posterior através do amplificação da região V3 do rDNA 16S. Após separação dos fragmentos de DNA em gel por diferenciação do conteúdo e distribuição de bases GC, seguidas de identificação por sequenciamento do DNA bacteriano das bandas, a microbiota foi descrita, sendo observados diferentes perfis antes e após o cultivo em placas.

Yang *et al.* (2007) aplicaram a técnica para comparar a comunidade bacteriana do intestino e outros órgãos de baiacu (*Takifugu obscurus*) alimentado com dieta natural ou artificial. Após extração e amplificação do DNA dos tecidos, DGGE foi conduzida a fim de separar os produtos do PCR. As bandas do gel, representando a diversidade bacteriana, foram selecionadas para seqüenciamento e identificação. As espécies intestinais diferiram das demais, estando

presentes provavelmente em função do ambiente aquático e dieta. As comunidades variaram entre peixes alimentados com dieta artificial e natural, corroborando o observado em abalone (*Haliotis discushannai*) por Tanaka *et al.* (2004). Os autores encontraram maior diversidade bacteriana nos intestinos de indivíduos alimentados com dieta artificial que com alga marinha.

Merrifield *et al.* (2009) investigaram, no trato intestinal de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a população bacteriana residente e não residente utilizando métodos tradicionais e moleculares. Foram analisadas digesta e mucosa intestinal, a qual apresentou maior contagem bacteriana. Bactérias do grupo das *Pseudomonas* e Enterobacteriaceas constituíram cerca de 80% da população alóctone e 60% da autóctone. Resultados da DGGE indicaram a presença de comunidades complexas em toda superfície intestinal. Mesmo sendo distintas, por apresentarem bandas diferentes, as populações autóctone e alóctone foram similares em 70%.

De acordo com Pond *et al.* (2006), estudos com truta arco-íris contavam mais com as técnicas bacteriológicas para o isolamento e posterior caracterização de espécies bacterianas. Além disso, em se tratando da microbiota intestinal de peixes, a maioria destes se concentrou na população alóctone e poucos consideraram as bactérias aderidas ao epitélio intestinal. Embora o conteúdo intestinal é de interesse geral para a análise da interação de suplementos alimentares, imunidade e microbiota do hospedeiro, a superfície do epitélio é mais relevante. Uma vez conhecendo-se a microbiota autóctone da espécie estudada, os autores sugerem posterior aplicação no monitoramento da microbiota intestinal após o uso de dietas contendo prebiótico. Apesar da variação da microbiota em função de diferentes ambientes de cultivo dificultar a avaliação da administração de probióticos na melhora da saúde do hospedeiro, pode ser possível o desenvolvimento de primers específicos para a bactéria cujo crescimento é promovido por certos compostos prebióticos (POND *et al.*, 2006).

O jundiá e a tilápia

O jundiá (*Rhamdia quelen*) alimenta-se de peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos, com clara preferência por peixes (MEURER e ZANIBONI FILHO, 1997). Os organismos encontrados no conteúdo estomacal do jundiá não são restritos ao habitat bentônico, indicando que a espécie é generalista com relação à escolha de alimento (GUEDES, 1980). O jundiá apresenta excelentes características zootécnicas. Segundo Fracalossi *et al.* (2002) e Salhi *et*

al. (2004), a espécie apresenta resistência ao manejo, altas taxas de crescimento mesmo durante as baixas temperaturas de inverno na região sul do Brasil, Argentina e Uruguai, fácil reprodução em cativeiro, boa eficiência na conversão de alimento, além de carne saborosa e sem espinhos intramusculares. Em função do crescente interesse na criação comercial da espécie (MEYER e FRACALOSSI, 2005), o número de trabalhos realizados pertinentes à nutrição do jundiá aumentou nos últimos anos.

O efeito dos teores de proteína e energia da dieta sobre seu desenvolvimento foi estudado por Machado *et al.* (2002), Salhi *et al.* (2004) e Meyer e Fracalossi (2004). Melo *et al.* (2002) verificaram o efeito de dietas com diferentes fontes de lipídio no desenvolvimento corporal de alevinos. Já Coldebella e Radünz Neto (2002) compararam diferentes fontes protéicas (levedura de cana, farelo de soja e farinha de carne e ossos) na alimentação de alevinos, enquanto que Lazzari *et al.* (2006), compararam as combinações de fontes protéicas (farelo de soja, levedura, farinha de carne e ossos e farinha de peixe).

A exigência de aminoácidos foi estimada por Meyer e Fracalossi (2005), baseada na composição aminoacídica do tecido muscular de jundiá, e por Montes-Girao e Fracalossi (2006), pela determinação da exigência de lisina e aplicação do conceito de proteína ideal, a partir da composição corporal em aminoácidos. Oliveira Filho e Fracalossi (2006), ao quantificar a digestibilidade de diferentes ingredientes para juvenis de jundiá, relataram que este digere mais eficientemente ingredientes protéicos que energéticos, de modo similar a peixes carnívoros. Os autores concluíram que a espécie estudada tem hábito alimentar onívoro, com tendência à carnivoría. Após experimento realizado com alevinos de jundiá alimentados com dietas contendo diferentes proporções de carboidrato (na forma de dextrina) e lipídio, Moro *et al.* (2010) recomendaram a inclusão de 16% e 6,5%, respectivamente, na dieta, sugerindo que a espécie utiliza de forma limitada o carboidrato dietético, similar ao que acontece com uma espécie carnívora.

Portanto, o jundiá parece usar o carboidrato da dieta com menor eficiência que outros onívoros. Além disso, a espécie apresenta morfologia gastrointestinal próxima a uma espécie carnívora, com intestino curto, embora escolha itens alimentares variados em sua dieta natural. Já a tilápia, um onívoro típico, apresenta intestino longo e tolera maiores teores de carboidrato na dieta.

Depois das carpas e salmónídeos, as tilápias são o terceiro grupo de peixes mais cultivados no mundo (FAO, 2002). Dentre as várias

espécies, destaca-se a tilápia nilótica que em 2000 representou cerca de 82% da produção mundial (FAO, 2002). Apresentando boas características de cultivo, toleram grande amplitude térmica, variações nas taxas de oxigênio dissolvido, salinidade, pH, intensidade luminosa e fotoperíodo (MUIR *et al.*, 2000).

De hábito alimentar onívoro, tem preferência por itens vegetais e detritos, cuja digestão é favorecida pelo baixo pH estomacal e elevado comprimento intestinal, através da hidrólise ácida da celulose e maior período de retenção da digesta (RUST, 2002; LEENHOUWERS *et al.*, 2008). Além disso, a ampla distribuição de enzimas digestivas ao longo do intestino permite a assimilação de grande variedade de itens alimentares (TENGGARJARENKUL *et al.*, 2000).

Anatomicamente e histologicamente simples comparado com mamíferos, o intestino de tilápia se parece com o de outros peixes taxonomicamente relacionados, sem regiões altamente diferenciadas ou tipos de células (MURRAY *et al.*, 1996; GARGIULO *et al.*, 1998). Devido à ausência de glândulas multicelulares, como nos mamíferos, a origem de enzimas digestivas no intestino de peixes não é tão evidente (PATT e PATT, 1969). Contudo, aspectos histológicos indicam a função absorptiva do intestino (GARGIULO *et al.*, 1998).

A absorção é favorecida pelo amplo comprimento intestinal, bem como pelo aumento da superfície epitelial proporcionado pelas vilosidades. Sendo projeções da mucosa, favorecem a mistura entre alimento, sucos hepático e pancreático, e muco secretado pelas células caliciformes (GRAU *et al.*, 1992).

A porção distal intestinal é morfologicamente similar à proximal, apresentando vilosidades mais curtas e menos ramificadas (GAUGIULO, 1998). A espessura do tecido muscular é a mesma do intestino proximal, diferentemente de outras espécies como a dos bagres, que apresentam a região posterior notavelmente mais musculosa que a anterior (GRAU *et al.*, 1992). O desenvolvimento da musculatura retal está relacionado ao conteúdo mineral dietético (CACECI e HRUBEC, 1990). As células epiteliais contêm vesículas localizadas na região supra nuclear, que são esvaziadas após alimentação, como observado em estudo realizado com bagres (GAUTHIER e LANDIS, 1972).

Segundo Gargiulo *et al.* (1998), aspectos estruturais da tilápia indicam a especialização de regiões intestinais. Mas diferentemente de outras espécies teleosteanas, o intestino proximal é importante para degradação de proteínas, apresentando maior atividade pinocítica, enquanto o segmento distal está mais relacionado com a absorção

lipolítica, devido à presença de vacúolos citoplasmáticos nas células desta região.

Enzimas digestivas estão entre os fatores mais importantes que determinam capacidade digestória e, portanto, eficiência alimentar em peixes (LEMIEUX *et al.*, 1999). Garcia-Gallego *et al.* (1995) sugerem a possibilidade da tilápia compensar a redução da ingestão de alimento pelo aumento da capacidade de hidrólise da amilase e lipase.

Jun-sheng *et al.* (2006) demonstraram que a atividade enzimática reduz gradualmente à medida que o quimo percorre o trato intestinal, provavelmente devido à degradação das enzimas provenientes do pâncreas.

Avaliando atividade enzimática intestinal de espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares, Harpaz e Uni (1999), observaram perfis digestivos variados. Melhores taxas de eficiência alimentar podem ser obtidas a partir do equilíbrio entre a capacidade enzimática de cada espécie e níveis de dissacarídeos dietéticos, prevenindo-se, por exemplo, seu excesso em dietas para carnívoros.

Em geral, peixes apresentam baixo aproveitamento de carboidratos na dieta (SHIAU, 1997). Diferentes tipos de carboidrato são utilizados de forma distinta, havendo alguns fatores associados a sua utilização em peixes tropicais. Sabe-se que esta é influenciada pela frequência alimentar, já que altera a atividade de carboidrases. A absorção intestinal de carboidratos é reduzida quando dietas são ricas em fibras, independente da fonte. A capacidade de utilização também depende do tamanho ou idade do peixe. Em tilápia, a exigência nutricional de niacina parece variar em função da fonte de carboidrato na dieta. Por outro lado, a inclusão de carboidratos complexos pode economizar proteína, quando o nível desta é baixo na dieta (SHIAU, 1997).

JUSTIFICATIVA

Dependendo da espécie cultivada, carboidratos podem estar largamente presentes nas dietas formuladas para peixes. Utilizados como fonte energética, são bastante disponíveis e apresentam baixo custo, mas podem ser incluídos na dieta em níveis acima daqueles metabolizados eficientemente pelos peixes (HEMRE *et al.*, 2002). Apesar do desenvolvimento de estudos que indiquem o envolvimento de bactérias gastrointestinais com funções nutricionais, mais ênfase em pesquisa se faz necessária para o estabelecimento de sua aplicação na nutrição de peixes (NAYAK, 2010).

Neste sentido, conhecer a relação entre as fontes de carboidrato utilizadas na dieta e a microbiota bacteriana do trato intestinal de peixes é essencial. Tais estudos podem contribuir com a compreensão da fisiologia da nutrição das espécies em relação à utilização de carboidratos e, conseqüentemente, auxiliar na formulação e industrialização de dietas destinadas à criação comercial das mesmas.

OBJETIVO GERAL

Estudar a população bacteriana do trato intestinal de jundiá (*R. quelen*) e tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes fontes de carboidrato na dieta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, no trato intestinal de jundiá e tilápia, a distribuição de bactérias totais e capazes de degradar amido, celulose, proteína, lipídeo, através da utilização de meios de cultura seletivos;

Identificar a porção intestinal que apresenta maior contagem de bactérias amilolíticas para cada espécie;

Estimar a população bacteriana intestinal de um peixe onívoro com tendência à carnívora, de intestino curto, em relação a outro tipicamente onívoro, com intestino longo, após alimentação com dietas semi-purificadas com diferentes fontes de carboidrato (milho, trigo, fécula de mandioca, quirera de arroz e dextrina).

O artigo científico que se segue foi redigido conforme as normas para submissão no periódico *Journal of Fish Biology* (QUALIS A2).

Microbiota de jundiá *Rhamdia quelen* e tilápia *Oreochromis niloticus* e carboidrato dietético

Microbiota de jundiá *Rhamdia quelen* e tilápia *Oreochromis niloticus* e carboidrato dietético

F. S. PEDROTTI¹, S. DAVIES², D. MERRIFIELD², M. R. F. MARQUES¹, A. P. M. FRAGA¹, J. L. P. MOURIÑO¹ AND D. M. FRACALOSI^{1*}

¹Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. ²Aquaculture and Fish Nutrition Research Group, School of Biological Sciences, University of Plymouth, Plymouth, UK.

*Autor correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC 88034-001, Brasil; Telefone: +554833895216; Endereço eletrônico: deboraf@cca.ufsc.br.

Palavras-chave: onívoro, peixe, amido, bactéria, amilolítica, alóctone.

RESUMO

A população bacteriana do trato intestinal de jundiá *Rhamdia quelen* e tilápia *Oreochromis niloticus* foi comparada. Há bactérias na microbiota intestinal de tilápia e jundiá capazes de digerir os macro nutrientes (proteína, lipídios e carboidratos) presentes nas dietas, estando, em geral, em maiores números na tilápia. A distribuição de grupos bacterianos variou ao longo do trato intestinal, sendo diferente entre as espécies estudadas. O jundiá apresentou maior crescimento de bactérias proteolíticas e lipolíticas na porção posterior, onde também ambas espécies tinham mais bactérias amilolíticas. Desta forma, pode haver maior degradação de amido por enzimas exógenas provenientes da microbiota na porção final do intestino, o que aumentaria a disponibilidade do nutriente para o hospedeiro. Comparou-se também a microbiota intestinal entre as duas espécies, após a administração de dietas contendo milho, trigo, mandioca, arroz ou dextrina. Os jundiás alimentados com dieta contendo arroz apresentaram maior contagem de bactérias totais. Por outro lado, quando mandioca ou milho foi utilizado como fonte de carboidrato, a população de bactérias amilolíticas foi mais alta em tilápia. A microbiota bacteriana presente na parede intestinal dos peixes foi sensível a dieta administrada, que alterou sua composição. Foi detectada bactéria do filo Fusobacteria em jundiás alimentados com dietas contendo arroz, e contendo mandioca, dextrina, arroz e milho para tilápia. Foi evidenciada diferenciação da microbiota de jundiá e tilápia, já que foram observadas apenas no primeiro, bactérias do grupo das Spirochaetales, comuns nos tratamentos com milho, mandioca e dextrina. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da microbiota intestinal na digestão de carboidratos em peixes, associando-se técnicas bacteriológicas convencionais com moleculares.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal dos peixes é influenciada pela dieta, sendo específica e composta por bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e obrigatórias (Ringo *et al.*, 1995; 2006a; Ringo & Olsen, 1999). É altamente dependente da colonização bacteriana durante os estádios iniciais de desenvolvimento do peixe, variando com as condições às quais está submetido (Olafsen, 2001; Ringo & Birkbeck, 1999; Ringo *et al.*, 2006b).

Segundo Clements (1997), bactérias anaeróbias podem contribuir com a nutrição de peixes suplementando com a síntese de ácidos graxos voláteis. Ainda, de acordo com Nayak (2010), a síntese de diferentes vitaminas e aminoácidos por bactérias gastrointestinais aeróbias, anaeróbias e aeróbias facultativas é relatada em peixes como carpa comum *Cyprinus carpio* L. 1758, bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818) e tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* L. 1758. Em garoupa *Epinephelus malabaricus* (Block & Schneider 1801), Lin *et al.* (2010) demonstraram a produção de cianocobalamina por bactérias colonizadoras do trato intestinal em quantidades suficientes para suprir a exigência da espécie.

Tradicionalmente, técnicas bacteriológicas convencionais são utilizadas no estudo da microbiota intestinal de peixes, incluindo crescimento em meios seletivos e não seletivos, isolamento e caracterização fenotípica. Contudo, métodos moleculares baseados em PCR e sequenciamento do rDNA 16S são cada vez mais aplicados no campo da ecologia microbiana (Hovda *et al.*, 2007), permitindo a avaliação de comunidades complexas e determinação de populações dominantes (Pond *et al.*, 2006).

Em ensaio alimentar realizado por Ringo *et al.* (2008) com salmão do Atlântico *Salmo salar* L. 1758, por meio de técnicas moleculares, foi demonstrada a sensibilidade da composição da microbiota autóctone e alóctone para alterações dietéticas.

Em geral, peixes apresentam baixo aproveitamento de carboidrato na dieta. Diferentes tipos de carboidrato são utilizados de forma distinta (Shiau, 1997). Enzimas digestivas estão entre os fatores mais importantes que determinam a capacidade digestória e, conseqüentemente, a eficiência alimentar em peixes (Lemieux *et al.*, 1999).

A microbiota bacteriana do trato gastrointestinal de peixes representa um importante e diversificado potencial enzimático, o qual pode interferir consideravelmente em grande parte do metabolismo do animal hospedeiro (Bairagi *et al.*, 2002). Bactérias intestinais residentes, que poderiam ser importantes para a digestão, podem produzir enzimas extracelulares que auxiliam o processo de decomposição alimentar (Minami *et al.*, 1972; Stickney & Shumway, 1974; Lesel *et al.*, 1986; Kono *et al.*, 1987; Rimer & Wiebe, 1987; Cahill, 1990; Sugita *et al.*, 1997). Neste caso, tais bactérias têm atividade enzimática relacionada ao substrato degradado.

O jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824) parece usar o carboidrato da dieta com menor eficiência que outros onívoros. A

espécie apresenta morfologia gastrointestinal próxima a uma espécie carnívora, com intestino curto, embora escolha itens alimentares variados em sua dieta natural (Moro *et al.*, 2010). Já a tilápia, um onívoro típico, tolera maiores teores de fontes vegetais na dieta (Leenhouders *et al.*, 2008). A absorção é favorecida pelo comprimento intestinal, bem como pelo aumento da superfície epitelial proporcionado pelas vilosidades. Projeções da mucosa, elas favorecem a mistura entre alimento, sucos hepático e pancreático, e muco secretado pelas células caliciformes (Grau *et al.*, 1992).

Utilizados como fonte energética, os carboidratos são bastante disponíveis para a produção de rações para espécies aquícolas e apresentam baixo custo, mas podem ser incluídos na dieta em níveis acima daqueles metabolizados eficientemente pelos peixes (Hemre *et al.*, 2002). Apesar do desenvolvimento de estudos que indiquem o envolvimento de bactérias gastrointestinais com funções nutricionais, mais ênfase em pesquisa se faz necessária para o estabelecimento de sua importância para a nutrição de peixes (Nayak, 2010). Neste contexto, o presente estudo objetivou estudar a população bacteriana do trato intestinal de jundiá e tilápia; e comparar as espécies, quanto a população de bactérias amilolíticas intestinais e bactérias totais, avaliando-se o efeito de diferentes fontes de carboidrato na dieta.

MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio alimentar foi realizado no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), enquanto as análises bacteriológicas foram realizadas no setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). As análises de composição proximal das dietas foram conduzidas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LABNUTRI). Estes laboratórios estão vinculados ao Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Já a extração de DNA foi efetuada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, enquanto as análises moleculares, no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Plymouth (UoP), Reino Unido.

Peixes e condições experimentais

Os jundiás e tilápias foram provenientes da Piscicultura Panamá em Paulo Lopes-SC (Latitude: -27°57'38.93"S e Longitude: -

48°45'27.90"O) e Fundação Municipal 25 de Julho em Joinville-SC (Latitude: -26°18'99.48" e Longitude: -48°92'00.59"), respectivamente.

Realizaram-se dois ensaios: no primeiro, foram comparadas as contagens de bactérias totais, amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas nas porções anterior, média e posterior do trato intestinal de jundiá e tilápia; no segundo, foram comparadas as contagens bacterianas entre as espécies de peixes, bem como entre diferentes fontes de carboidrato (milho, trigo, fécula de mandioca, quirera de arroz e dextrina).

No primeiro ensaio, jundiás ($57,8 \pm 6,0$ g) e tilápias ($41,3 \pm 10,0$ g) foram mantidos em tanques cilíndrico-cônicos de fibra de vidro de 200 L acoplados a um sistema fechado de recirculação de água a 28°C. A biomassa por tanque foi mantida em torno de 2,5 para o jundiá e 3,0 kg para a tilápia. Os peixes foram alimentados com dieta comercial extrusada (42% de proteína bruta; Supra Alisul Alimentos S/A, Itajaí, SC, Brasil) duas vezes por dia, até a saciedade aparente. As concentrações de amônia total, nitrito e pH foram monitoradas a cada três dias, enquanto que o oxigênio dissolvido e a temperatura da água, diariamente, utilizando-se oxímetro e termômetro digital. O fotoperíodo foi mantido em 14 h. Amônia total e nitrito foram monitorados de acordo com a metodologia descrita por Boyd & Tucker (1992) e a amônia não ionizada calculada de acordo com Piper *et al.* (1982). Após 15 dias de aclimação, cinco peixes de cada espécie foram submetidos a jejum por 24 h e sacrificados por aprofundamento anestésico (benzocaína 50 mg/L). As porções anterior, média e posterior do intestino dos peixes foram amostradas para observar o crescimento bacteriológico em cinco diferentes meios de cultura.

No segundo ensaio, as dietas experimentais, contendo diferentes fontes de carboidrato, foram fornecidas duas vezes por dia aos jundiás ($92,32 \pm 24,94$ g) e tilápias ($100,60 \pm 37,65$ g) a uma taxa de 30 g kg⁻¹ e 35 g kg⁻¹ do peso vivo, respectivamente. Os animais foram mantidos a 28°C em tanques cilíndrico-cônicos de 200 L, com biomassa em torno de 2,5 e 3,0 kg, respectivamente, constituindo uma unidade experimental. A dieta basal (controle, Tabela I) era composta de ingredientes semi-purificados e foi formulada para conter 34% de proteína bruta e 3650 kcal/kg de energia metabolizável estimada, atendendo às exigências protéicas e energéticas do jundiá (Meyer & Fracalossi, 2004). A fibra alimentar das dietas experimentais foi estimada a partir do conteúdo em fibra alimentar dos ingredientes, obtido pelo método enzimático gravimétrico 985.29 da AOAC (1999). A quantidade de fibra alimentar da celulose foi equivalente ao nível de inclusão de celulose na dieta.

A concentração dos demais nutrientes foi calculada com base nas exigências do bagre americano. As demais dietas experimentais constam de 30% de diferentes fontes de amido - milho, trigo, fécula de mandioca ou quirera de arroz - e 70% da dieta basal. As fontes de carboidrato, com exceção da dextrina, foram escolhidas por serem ingredientes rotineiramente utilizados em dietas comerciais. As dietas experimentais foram elaboradas misturando-se os ingredientes secos e posteriormente o óleo e a água. As misturas foram peletizadas num moedor de carne, produzindo péletes com diâmetro de 8 mm. As dietas foram secas em estufa a 50°C por 6 h, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C até sua utilização.

Após aclimação às condições experimentais por 10 dias, a porção posterior dos intestinos foi amostrada, já que apresentou a maior contagem total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no meio de cultura seletivo para bactérias amilolíticas no ensaio anterior. Foram amostrados intestinos de três animais por tanque, quinzenalmente, durante 45 dias. Depois de jejum de 24 h, os peixes eram sacrificados com benzocaína (50 mg/L) e seus intestinos coletados. A porção intestinal amostrada foi semeada nos meios de cultura para bactérias totais e amilolíticas. Foram comparadas as contagens obtidas entre as espécies de peixes avaliadas, bem como entre as fontes de carboidrato nas diferentes dietas.

Durante o primeiro e segundo ensaio, os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se em 6,74; 7,11 mg L⁻¹; 28,21°C e inferior a 0,25 mg L⁻¹, respectivamente, para pH, oxigênio dissolvido, temperatura e amônia total.

Avaliação bacteriológica do trato intestinal

No primeiro ensaio, seguindo metodologia utilizada por Bairagi *et al.* (2002), o trato intestinal dos peixes foi retirado e dividido nas porções anterior, média e posterior. Cada porção foi macerada e homogeneizada com água peptonada. Da solução, foram realizadas diluições seriadas (fator 1:10) para posterior semeadura de alíquotas de 0,1 mL em placas de Petri, contendo os diferentes meios de cultura para a quantificação de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 30°C. Aquelas que apresentam crescimento bacteriano foram submetidas à contagem (UFC g⁻¹ de intestino). A quantificação bacteriana das porções do trato intestinal foi estimada pela multiplicação do número de UFC de cada placa por sua respectiva diluição, utilizando-se os seguintes meios de cultura: tryptic

soy agar (TSA), agar de amido (SA), agar de carboximetilcelulose (CMCA), agar tributirina (TA) e agar peptona (PA). No segundo ensaio, foi retirado o trato intestinal dos peixes conforme descrição anterior, e o crescimento em meio de cultura TSA e SA foi avaliado somente na porção posterior dos intestinos.

Tabela I. Formulação e composição proximal da dieta basal utilizada no segundo ensaio.

Ingredientes	g kg ⁻¹ (base seca)
Albumina ¹	455,10
Dextrina ²	300,00
Celulose microfina ²	99,90
Premix vitamínico-micromineral ³	30,00
Premix macromineral ⁴	55,00
Óleo de soja	30,00
Óleo de fígado de bacalhau ⁵	30,00
Composição proximal, % (base seca)	
Matéria seca	935,40
Proteína bruta	385,50
Extrato etéreo	60,60
Energia bruta ⁶	19,05
Matéria mineral	96,70
Fibra alimentar ⁷	99,40

¹ Izumi Indústria e Comércio Ltda. (Guapirama, PR, Brasil).

² Rhoister Indústria e Comércio Ltda. (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil);.

³ Nutron Alimentos (Toledo, PR, Brasil), composição/kg de produto: Ácido fólico 250 mg, Ácido pantotênico 5.000 mg, Antioxidante 0,6 g, Biotina 125 mg, Cobalto 25 mg, Cobre 2.000 mg, Colina 75.000 mg, Ferro 13.820 mg, Iodo 100 mg, Manganês 3.750 mg, Niacina 5000 mg, Selênio 75 mg, Vit. A 1.000.000 UI, Vit. B₁ 1250 mg, Vit. B₁₂ 3.750 mg, Vit. B₂ 2.500 mg, Vit. B₆ 1.785 mg, Vit. C 42.000 mg, Vit. D₃ 500.000 UI, Vit. E 20.000 UI, Vit. K 35.000 mg, Zinco 17.500 mg.

⁴ Fosfato bicálcico 454 g, Sulfato de potássio 297 g, Cloreto de sódio 174 g, Sulfato de magnésio 75 g.

⁵ Delaware Ltda (Porto Alegre, RS, Brasil).

⁶ Expressa em kJ g⁻¹.

⁷ Método enzimático-gravimétrico (AOAC, 1999).

Meios de cultura

O meio TSA (Oxoid[®]), no qual crescem diversos tipos de bactérias heterotróficas, caracteriza-se como não seletivo, contendo triptona e peptona como fontes de proteína, lipídios e carboidratos. O crescimento neste meio foi utilizado para estimativa da concentração de bactérias totais presentes nas amostras analisadas, a fim de conhecer a proporção daquelas amilolíticas.

Os meios de cultura seletivos foram formulados com base na composição dos meios utilizados por Bairagi *et al.* (2002). O meio SA, seletivo para bactérias que necessitam ou toleram concentrações elevadas de amido para seu crescimento, é composto por 30 g de agar amido (Starch agar, Himedia[®]), 8 g de amido solúvel (Soluble starch, Himedia[®]) e 0,5 g de NaCl por litro de meio de cultura preparado. Assumiu-se que bactérias que apresentaram crescimento em SA possuem atividade amilolítica.

Os meios CMCA, TA e PA foram utilizados para estimar a população da microbiota intestinal que possui atividade celulolítica, lipolítica e proteolítica, respectivamente. A composição do meio CMCA (g L⁻¹) foi: 10 g de carboximetilcelulose sal sódico, 15 g de Agar Agar (Difco[®]), 2 g de triptona bacto agar (Himedia[®]), 4 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de MgCl₂, 0,001 g de CaCl₂ e 0,004 g de FeSO₄.7H₂O.

Já a do meio TA (g L⁻¹) foi: 10 mL de tributirina (Himedia[®]), 23 g de agar base tributirina (Tributyryn agar, Himedia[®]), 0,5 g de NaCl.

O meio PA continha (g L⁻¹): 5 g de Peptona (Casein Peptone, Himedia[®]), 5 g de extrato de carne (Protose Beef extract, Himedia[®]), 20 g de Agar Agar (Difco[®]) e 0,5 g de NaCl.

Identificação molecular da população microbiana

No 45° dia de ensaio, 6 h após a última alimentação, seis tilápias e seis jundiás foram retirados de cada tratamento dietético e sacrificados com benzocaina (50 mg L⁻¹). Sob temperatura refrigerada e condições assépticas, o tecido distal intestinal foi coletado e lavado em solução tampão fosfato. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido durante a coleta, sendo posteriormente transferidas a -80°C.

Para cada espécie, as seis amostras de tecido intestinal provenientes da mesma dieta (arroz, dextrina, mandioca, milho ou trigo) foram agrupadas. A partir de 60 mg de cada *pool*, foi realizada extração de DNA através do kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

A identificação molecular foi conduzida de acordo com método descrito por Merrifield *et al.* (2009). Para a amplificação por PCR da região V3 dos genes do rRNA 16S, utilizaram-se os primers P3 e P2. Foram adicionados em cada tubo de PCR 1 μL de P2 e 1 μL de P3 (50 pmol μL^{-1} ; MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemanha), 3 μL de amostra de DNA e 25 μL de ReadyMixTM Taq PCR Reaction Mix com MgCl_2 (Sigma, St Louis, MO, EUA). O volume final foi ajustado a 50 μL com água molecular Milli-Q, atingindo concentração final de 1.5 U de Taq DNA polimerase, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,001% de gelatina e 0.2 mM de dNTPs. Utilizaram-se ciclos térmicos a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min e 72 °C por 3 min utilizando-se o *GeneAmp*® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, CA, EUA).

A eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE) foi conduzida no sistema DGGE-2001 (C.B.S. scientific, Del Mar, CA, EUA), utilizando-se 15 μL do produto do PCR padronizado (a 40 ng μL^{-1}) em gel de poliacrilamida a 8% (16 cm x 16 cm x 1mm) com gradiente desnaturante a 20-50% (onde 100% desnaturante é 7 M uréia e 40% formamida). As amostras foram corridas em mesmo gel, a 65 V por 16 h a 60°C em 1 x TAE buffer (66 mM de Tris, 5 mM de Na acetato e 1 mM de EDTA). Após coloração com *Sybr green*, as bandas da DGGE foram visualizadas no *Bio-Rad universal hood II* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e o gel fotografado sob luz ultravioleta, sendo a imagem otimizada para análises através do ajuste da escala de cinza e contraste (Figura 1).

Produtos de PCR provenientes das 26 bandas selecionadas foram limpos (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen) e sequenciados por *GATC-biotech laboratories* (Konstanz, Alemanha). Após a busca no *GenBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), os grupos taxonômicos para os quais as seqüências apresentaram mais alta similaridade foram detectados.

Análise estatística

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. Os dados de contagem bacteriana foram submetidos ao teste de Bartlett de homocedasticidade de variâncias. Aqueles que apresentaram heterogeneidade das variâncias foram transformados em log (x+1) antes de serem analisados. O primeiro ensaio foi submetido a análise de variância em arranjo fatorial (2x2) entre as espécies de peixe e porções intestinais, em cada meio. Quando detectadas diferenças entre as médias, estas foram comparadas através

do teste de Tukey. No segundo ensaio, para detectar o possível efeito da fonte de carboidrato nas contagens, foi aplicada análise de variância. Através do teste-t, foram comparadas as contagens microbiológicas entre as espécies para cada fonte de carboidrato. O nível mínimo de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

As contagens bacterianas obtidas das diferentes porções intestinais dos peixes alimentados com dieta comercial (ensaio 1) demonstram que a tilápia apresentou mais bactérias totais e específicas que o jundiá no trato intestinal (Tabela II). Houve interação entre a espécie e a porção intestinal avaliada, mas não foi detectada diferença estatística quando se comparou o crescimento bacteriano entre as porções intestinais para tilápia.

Já em jundiá, detectou-se maior contagem bacteriana na porção posterior, onde mais bactérias celulolíticas, proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas e totais estariam mais presentes. A porção intestinal média apresentou menor contagem nos meios PA e TSA ou crescimento não detectado em CMCA, SA e TA.

No segundo ensaio, quando se comparou diferentes fontes de carboidrato na dieta, a porção posterior foi selecionada para contagem já que esta apresentou a maior concentração de bactérias amilolíticas ao longo do trato intestinal no primeiro ensaio em jundiá. Não houve diferença entre as fontes de carboidrato. Foram comparadas as espécies dentro de cada fonte (Tabela III). Jundiás alimentados com dietas contendo arroz apresentaram maior contagem de bactérias totais que tilápias, porém menor população de bactérias amilolíticas quando mandioca ou milho foi utilizado como fonte de carboidrato. As contagens bacterianas não foram diferentes entre as espécies no mesmo meio de cultura e fonte de carboidrato, avaliando-se as dietas contendo dextrina e trigo.

Tabela II. Valores médios (\pm desvio padrão) das contagens [$\log(x+1)$ de UFC g^{-1}] de bactérias celulolíticas, proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas e totais das porções intestinais anterior, média e posterior, entre tilápia e jundiá alimentados com ração comercial (ensaio 1).

Espécie	Porção intestinal	Bactérias celulolíticas	Bactérias proteolíticas	Bactérias amilolíticas	Bactérias lipolíticas	Bactérias totais
Tilápia	Anterior	5,95 \pm 1,02 ^{A, a}	5,98 \pm 1,07 ^{A, a}	5,98 \pm 0,03 ^{A, a}	5,37 \pm 1,35 ^{A, a}	5,80 \pm 0,08 ^{A, a}
	Média	5,75 \pm 1,72 ^{A, a}	6,03 \pm 0,19 ^{A, a}	6,03 \pm 0,46 ^{A, a}	6,13 \pm 0,63 ^{A, a}	6,34 \pm 0,62 ^{A, a}
	Posterior	5,86 \pm 1,68 ^{A, a}	6,52 \pm 0,46 ^{A, a}	6,52 \pm 0,14 ^{A, a}	6,46 \pm 0,36 ^{A, a}	6,64 \pm 0,41 ^{A, a}
Jundiá	Anterior	1,96 \pm 2,68 ^{B, c}	2,09 \pm 1,92 ^{B, b}	2,50 \pm 1,42 ^{B, c}	*	2,10 \pm 2,08 ^{B, c}
	Média	*	0,89 \pm 1,99 ^{B, c}	*	*	2,42 \pm 3,32 ^{B, c}
	Posterior	2,97 \pm 2,71 ^{B, b}	4,80 \pm 0,30 ^{B, b}	4,65 \pm 0,51 ^{B, b}	4,53 \pm 1,08 ^{B, b}	5,25 \pm 0,57 ^{B, b}

Análise de Variância (valor de P)

Espécie	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Porção intestinal	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Espécie x porção intestinal	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^{A, B} Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies pelo teste Tukey de comparação de médias ($P<0,05$).

^{a, b, c} Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as porções intestinais pelo teste Tukey de comparação de médias ($P<0,05$).

* Crescimento bacteriano menor que 10^{-1} UFC g^{-1} .

Tabela III. Valores médios (\pm desvio padrão) das contagens [$\log(x+1)$ de UFC g^{-1}] de bactérias amilolíticas e totais entre a porção intestinal posterior de tilápia e jundiá após 15 dias de alimentação com dietas contendo diferentes fontes de carboidrato (ensaio 2).

Espécie	Fonte de carboidrato	Bactérias amilolíticas	Bactérias totais
tilápia	Arroz	4,70 \pm 0,61 ^a	4,37 \pm 0,35 ^b
jundiá		4,91 \pm 1,37 ^a	5,23 \pm 0,72 ^a
tilápia	Dextrina	5,34 \pm 1,25 ^a	4,83 \pm 0,82 ^a
jundiá		5,64 \pm 0,03 ^a	5,51 \pm 0,50 ^a
tilápia	Mandioca	5,54 \pm 0,03 ^a	5,45 \pm 0,67 ^a
jundiá		3,77 \pm 0,84 ^b	4,47 \pm 0,69 ^a
tilápia	Milho	6,03 \pm 0,78 ^a	5,84 \pm 0,35 ^a
jundiá		4,94 \pm 1,77 ^b	6,03 \pm 0,75 ^a
tilápia	Trigo	4,70 \pm 0,68 ^a	5,34 \pm 0,77 ^a
jundiá		4,91 \pm 0,65 ^a	5,42 \pm 1,19 ^a

^{a,b} Letras distintas entre espécies, no mesmo grupo de bactérias e fontes de carboidrato, indicam diferenças significativas pelo teste-t de comparação de médias ($P < 0,05$).

A DGGE mostrou padrões de bandas distintos para os tratamentos dietéticos e espécies testadas no presente estudo, representando digitais das populações bacterianas presentes na parede intestinal dos peixes (Figura 1). Após sequenciamento, foi detectada fusobactérias em jundiás alimentados com dietas contendo arroz, e contendo mandioca, dextrina, arroz e milho para tilápia. Por outro lado, apenas em Jundiás foram observadas bactérias da ordem das Spirochaetales, comuns nos tratamentos com milho, mandioca e dextrina. Algumas bactérias não foram identificadas.

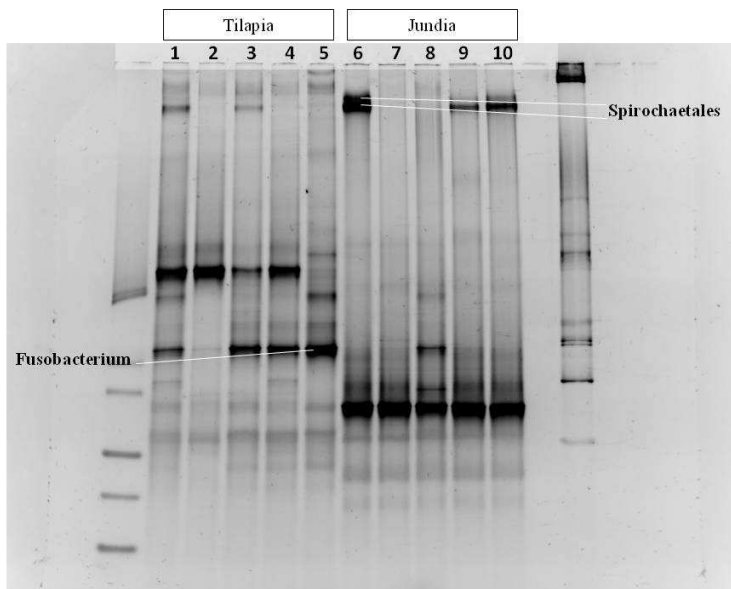


Figura I. Imagem negativa de eletroforese em gel gradiente desnaturante, corado com *Sybr Green*, da amplificação de 16S rRNA de bactéria por PCR. Padrões de bandas representam digitais das populações bacterianas presentes na parede intestinal de peixes. Cada coluna é composta do *pool* de seis tilápias (de 1 a 5) ou jundiás (de 6 a 10), alimentados com dietas experimentais contendo 30% de mandioca (1), trigo (2), dextrina (3), arroz (4), milho (5), milho (6), trigo (7), arroz (8), mandioca (9) e dextrina (10).

DISCUSSÃO

No trato intestinal, a tilápia apresentou mais bactérias totais e específicas que o jundiá, resultado que está de acordo com outros estudos que demonstram a diferenciação da microbiota entre espécies de peixes, bem como entre hábitos alimentares (herbívoro, onívoro e carnívoro) distintos (Bairagi *et al.*, 2002). Avaliando a população bacteriana aeróbica presente no trato de peixes por meio de método bacteriológico convencional, Bairagi *et al.* (2002) observaram variações entre as diferentes espécies de peixes testadas com relação às contagens de bactérias totais, em meio TSA (Tryptic Soy Agar, Oxoid®), bem como de amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas, em meios seletivos. A carpa indiana *Catla catla* (Hamilton 1822) apresentou

maior número de bactérias totais ($1,5 \times 10^5$ UFC g^{-1}), enquanto mais bactérias amilolíticas e celulolíticas estavam presentes no trato da herbívora carpa capim *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes 1844). Já a população lipolítica e proteolítica foi maior em carpa prateada *Hypophthalmichthys molitrix* (Richardson 1845) e indiana *Labeo rohita* (Hamilton 1822), respectivamente. O intestino da tilápia mossambica *O. mossambicus* (Peters 1852) promoveu o crescimento de 9×10^4 UFC g^{-1} em meio TSA, menor que o obtido para tilápia do Nilo.

No presente estudo obteve-se a contagem de $6,31 \times 10^5$; $2,19 \times 10^6$ e $4,37 \times 10^6$ UFC g^{-1} , para as porções anterior, média e posterior do intestino de tilápia, respectivamente. Por outro lado, Merrifield *et al.* (2009) observaram contagens bacterianas mais baixas em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), havendo maior crescimento de bactérias totais no intestino posterior ($2,40 \times 10^5$ UFC g^{-1}) que na porção anterior ($2,51 \times 10^4$ UFC g^{-1}). Em todos os meios avaliados, as contagens foram superiores para tilápia, mas, contrapondo os resultados de Merrifield *et al.* (2009), não foi detectada diferença estatística quando se comparou o crescimento bacteriano entre as porções intestinais. Os resultados indicam, portanto, que bactérias totais, bem como as degradadoras de carboximetilcelulose, proteína, amido e lipídio encontram-se igualmente distribuídas ao longo do intestino desta espécie.

Considerando-se a população de bactérias totais, outros estudos com espécies carnívoras também observaram maior contagem na porção posterior do intestino (Ringo *et al.*, 2006b; Hovda *et al.*, 2007). As contagens variaram de $6,31 \times 10^4$ a $3,16 \times 10^5$ UFC g^{-1} , respectivamente, próximas àquelas encontradas para a tilápia no presente estudo ($4,37 \times 10^6$ UFC g^{-1} para tilápia e $1,78 \times 10^5$ UFC g^{-1} para o jundiá) (Tabela II). Todavia, a comparação dos resultados obtidos com os dados de pesquisas anteriores é difícil, já que a microbiota depende do estágio de desenvolvimento do peixe e condições ambientais às quais está submetido (Pond *et al.*, 2006), além da porção intestinal amostrada, local de coleta, espécie do peixe e da própria análise aplicada (Hovda *et al.*, 2007).

Ao longo do trato intestinal em jundiá, a porção posterior apresentou mais bactérias amilolíticas, o que pode indicar maior degradação de amido por enzimas exógenas provenientes da microbiota na região. A maior atividade de amilase na região distal do trato já foi relatada por Dhage (1968). Adicionalmente, Bairagi *et al.* (2002) também observaram cepas produtoras de amilase, celulase, lipase e protease, comprovando a existência de outra fonte de enzimas digestivas

além da endógena. Contudo, mais pesquisas devem ser dedicadas a fim de elucidar o processo de absorção de carboidratos e a função da microbiota intestinal, para possibilitar futuras aplicações no campo de nutrição de peixes. O esclarecimento da função, do comportamento e da degradação de nutrientes por bactérias amilolíticas pode auxiliar o isolamento de cepas probióticas, visando ampliar a digestibilidade de carboidratos para peixes, especialmente os carnívoros, com limitada capacidade de utilizar este nutriente.

Sabe-se que a amilase é amplamente distribuída no trato intestinal de peixes de água doce e tem importante função na digestão do amido. Origina-se no pâncreas ou em células secretoras da parede intestinal. Além desta, as enzimas produzidas pela microbiota intestinal potencialmente têm papel importante, principalmente para substratos de difícil digestão, como a celulose (Smith, 1989). Segundo Sugita *et al.* (1997), diversos relatos sugerem a relação de simbiose entre peixe e microbiota intestinal, por meio da produção de substâncias bioativas. Estes autores realizaram ensaio com cinco espécies de peixes de água doce e demonstraram a significativa distribuição de bactérias produtoras de amilase entre a população bacteriana intestinal dos peixes, constituindo cerca de 31% das cepas isoladas. Dentre estas, destacaram-se as bactérias anaeróbias como maiores produtoras de amilase. Não obstante, cepas bacterianas altamente produtoras não foram encontradas em enguia japonesa *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel 1846), única espécie carnívora testada, estando presentes em altas densidades no trato intestinal dos peixes onívoros (Sugita *et al.*, 1997). Tais resultados corroboram as observações de Shimeno *et al.* (1977), que já havia detectado maior atividade amilática no trato de carpa comum *C. carpio*, de hábito onívoro, quando comparada ao olhete *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel 1845), peixe marinho carnívoro.

Pelo método tradicional de contagem da microbiota, Ringo *et al.* (2006b) também observaram variação na quantidade bacteriana ao longo das porções intestinais de bacalhau *Gadus morhua* L. 1758 e dieta administrada. Utilizando fontes de proteína distintas, maior número de bactérias totais estavam presentes na porção posterior, sendo que a contagem variou em função da fonte protéica.

Os resultados encontrados por Ringo *et al.* (2006b) demonstram que a microbiota do trato de peixes foi sensível à dieta, corroborando o presente estudo. Neste, houve influência nos grupos bacterianos, de forma que os jundiás alimentados com dieta contendo arroz apresentaram maior contagem de bactérias totais que tilápias. Por outro lado, quando mandioca ou milho foi utilizado como fonte de

carboidrato, a população de bactérias amilolíticas foi maior em tilápia. Contudo, avaliando-se as dietas contendo dextrina e trigo, não foi possível observar diferenças nas contagens bacterianas entre as espécies. Como a porção posterior foi avaliada, por apresentar a maior contagem em jundiá, as diferenças entre as espécies podem ter sido camufladas devido à maior aproximação das contagens de tilápia, naturalmente mais altas.

Quando foi avaliado o efeito das fontes de carboidrato no número de bactérias intestinais, não foram observadas alterações entre jundiá e tilápia. Os resultados sugerem que a população total e amilolítica colonizadora do trato sofre a mesma influência de carboidratos dietéticos distintos, ou mesmo que a detecção de diferenças pode ter sido prejudicada por outras fontes de variação. Spanggaard *et al.* (2000) relatam a dificuldade de analisar a microbiota do intestino de peixes, já que ocorre variação individual, sendo um fator que pode ter favorecido a semelhança das contagens observada no presente estudo. Talvez uma alimentação mais longa com as dietas experimentais pudesse evidenciar maior diferenciação quantitativa ou até qualitativa da microbiota entre as fontes de carboidrato. Outra possibilidade é que a técnica de semeadura em meio não represente todas as bactérias presentes no intestino, já que muitas não são cultiváveis, de acordo com Huber *et al.* (2004).

Por métodos moleculares, observaram-se padrões de bandas distintos para os tratamentos dietéticos e espécies testadas, evidenciando a diferenciação da microbiota de jundiá e tilápia. A dieta administrada alterou a composição da população bacteriana presente na parede intestinal dos peixes, sugerindo que a fermentação ou degradação do substrato proveniente de cada ingrediente pode favorecer o desenvolvimento de determinados grupos bacterianos.

As fontes de carboidrato utilizadas nas dietas variam quanto à estrutura das paredes celulares que envolvem o amido, proporções de amilose e amilopectina, presença de inibidores de amilase, viscosidade da digesta e atividade de fermentação microbiana, o que segundo Bach Knudsen (2001), contribuem para diferenças na digestibilidade do nutriente. Da mesma forma, o teor de fibra alimentar, equivalente a porção do alimento não digerida pelas enzimas digestivas dos animais, é suscetível à degradação em intensidade variável pela atuação microbiana simbiótica no intestino (Herrera *et al.*, 2001), sendo que a maior ou menor concentração nos ingredientes pode ter influenciado o desenvolvimento bacteriano diferenciado nos tratamentos dietéticos.

O filo Fusobacteria, detectado em jundiás (alimentados com dieta contendo arroz) e tilápias, compreende bactérias anaeróbias Gram negativas, incluindo cepas patogênicas para humanos, como as causadoras de doenças periodontais e úlceras na pele. Encontradas somente em jundiás, as bactérias do filo Spirochaetales são Gram negativas e quimioheterotróficas. A maioria é de vida livre e anaeróbica, sendo que algumas espécies são conhecidas por causar enfermidades em humanos, como leptospirose e sífilis (Pelczar *et al.*, 1996).

Em baiacu *Takifugu obscurus* (Abe 1949), Yang *et al.* (2007) também observaram alterações na composição da microbiota causadas pela dieta. Espécies de Spirochaetales, *Trichococcus*, Proteobacteria (subclasse Epsilon) e *Vibrio* estavam presentes no intestino dos peixes que receberam dieta artificial, enquanto naqueles alimentados com dieta natural as bactérias dominantes foram Gram positivas com baixo conteúdo de Guanina/Citosina. Da mesma forma, Tanaka *et al.* (2004) demonstraram diferenças na composição da microbiota do gastrópode abalone *Haliotis discus hannai* (Ino 1951) após jejum por uma semana, quando fusobactérias foram detectadas. Além disso, a diversidade bacteriana foi maior nos indivíduos alimentados com dieta artificial que com alga marinha.

Segundo Ringo *et al.* (2006b), a população intestinal bacteriana de bacalhau foi sensível a variações das fontes protéicas da dieta, com o predomínio de Firmicutes, e de Bacteroidetes e Proteobacteria gamma no trato gastrointestinal dos peixes alimentados com farinha de peixe e farelo de soja, respectivamente. Em garoupa *Epinephelus awoora* (Temminck & Schlegel 1842), a microbiota autóctone foi mais diversificada e menos abundante no intestino de peixes alimentados com ração que com dieta natural (Feng *et al.*, 2010). Com relação à população autóctone e alóctone, Han *et al.*, 2010 detectaram maior diversidade bacteriana na digesta, a qual apresentou alto coeficiente de similaridade com a dieta em carpa capim.

Mais pesquisas ainda são necessárias para melhor compreensão da microbiota intestinal dos peixes, envolvendo técnicas mais sofisticadas para identificação dos grupos bacterianos capazes de degradar amido. O método de quantificação bacteriana aplicado no presente estudo tem limitações, tanto pela necessidade de um grande número de réplicas, da coleta e análise simultânea das amostras, quanto pela amostragem das bactérias que compõem a microbiota intestinal, já que os meios de cultura formulados podem ser deficitários quanto às suas exigências nutricionais (Pond *et al.*, 2006). Sabe-se, além disso, que

significante proporção da microbiota bacteriana não é capaz de ser cultivada *in vitro* (Huber *et al.*, 2004).

Hovda *et al.* (2007) aplicaram a extração e análise do 16S rDNA diretamente de amostras do tecido, com o auxílio de primers, na caracterização da microbiota intestinal de Salmão do Atlântico *S. salar*. O método possibilitou a determinação de resultados diferentes daqueles obtidos pelo cultivo, sendo que outras espécies de bactérias foram detectadas como predominantes no trato. Desta forma, os autores propõem a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel (DGGE) como método alternativo para o estudo da microbiota intestinal de peixes. A associação de técnicas bacteriológicas convencionais de cultivo com moleculares é, portanto, válida para um estudo mais completo da população presente (Pond *et al.*, 2006).

Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se que a tilápia apresenta mais bactérias intestinais totais, amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas que o jundiá. A população de bactérias amilolíticas é maior na porção posterior de jundiá. As espécies apresentaram diferenciações entre as contagens de bactérias amilolíticas intestinais em função das fontes de carboidrato das dietas. A microbiota bacteriana presente na parede intestinal dos peixes foi sensível a dieta administrada, que alterou sua composição.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior (FUMDES) da Secretaria do Estado de Educação de Santa Catarina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas à primeira e última autora, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1999). In *Official Methods of Analysis*. 16th edn. (AOAC), Washington, DC, USA.
- Bach Knudsen, K. E. (2001) The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science Technology* **90**, 3-20.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Enzyme producing bacterial microbiota isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* **10**, 109-121.

- Bisset, A., Bowman, J. & Burke, C. (2006). Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **55**, 48-56.
- Boyd, C. E. & Tucker, C. S. (1992). Water quality and pond soil analyses for aquaculture. In *Alabama Agriculture Experimental Station*, pp. 183. Auburn University, AL, USA.
- Cahill, M. M. (1990). Bacterial microbiota of fishes: a review. *Microbial Ecology* **19**, 21-41.
- Clements, K.D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes (1997). In *Gastrointestinal Microbiology* (Gastrointestinal ecosystems and fermentations), Vol. 1 (Mackie, R. I. & White, B. A., eds.), pp. 156-198. Chapman and Hall, New York, NY, USA.
- Dhage, K. P. (1968). Studies of the digestive enzymes in the three species of the major carps of India. *Journal of Biological Sciences* **11**, 63-74.
- Feng, J. B., Hu, C. Q., Luo, P., Zhang, L. P. & Chen, C. (2010). Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck & Schlegel, 1842) fed two different diets. *Aquaculture Research* **41**, 1778-1790.
- Grau, A., Crespo, S., Sarasquete, M. C. & Gonzales de Canales, M. L. (1992). The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning electron microscope study. *Journal of Fish Biology* **41**, 287-303.
- Han, S., Liu, Y., Zhou, Z., He, S., Cao, Y., Shi, P., Yao, B. & Ringo, E. (2010). Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquaculture Research* **42**, 47-56.
- Hemre, G. I., Mommsen, T. P. & Krogdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* **8**, 175-194.
- Herrera, A. P. N., Santiago, G. S. & Medeiros, S. L. S. (2001). Importância da fibra na nutrição de coelhos. *Ciência Rural, Santa Maria* **31**, 557-561.
- Hovda, M. B., Lunestad B. T., Fontanillas, R. & Rosnes, J. T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **272**, 581-588.

- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. & Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **96**, 117-132.
- Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A. & Mochizuki, N. (2009). The sphingolipid transporter spns functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* **323**, 524-527.
- Kono, M., Matsui, T. & Shimizu, C. (1987). Decomposing bacteria in digestive tracts of cultured Red Sea bream and Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* **53**, 305-310.
- Leenhouwers, J. I., Pellikaan, W. F., Huizing, H. F. A., Coolen, R. O. M., Verreth, J. A. J. & Schrama, J. W. (2008). Fermentability of carbohydrates in an in vitro batch culture method using inocula from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Nutrition* **14**, 523-532.
- Lemieux, H., Blier, P. & Dutil, J. D. (1999). Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology Biochemistry* **20**, 293-303.
- Lesel, R., Fromageot, C. & Lesel, M. (1986). Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* **54**, 11-17.
- Lin, Y., Wu, J. & Shiau, S. (2010). Dietary cobalt can promote gastrointestinal bacterial production of vitamin B12 in sufficient amounts to supply growth requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* **302**, 89-93.
- Merrifield, D. L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S. J., Baker & R.T.M. (2009). Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* **40**, 1064-1072.
- Meyer, G. & Fracalossi, D. M. (2004). Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* **240**, 331-343.
- Minami, Z., Kajinta, M. & Hibino, S. (1972). Studies on the utilization of petro-yeast as diet of freshwater fish. I. The distribution of

- chitin-decomposing bacteria in digestive tracts. *Nippon Suisan Gakkaishi* **38**, 1013-1019.
- Moro, G. V., Camilo, R. Y., Moraes, G. & Fracalossi, D. M. (2010). Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research* **41**, 394-400.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* **41**, 1553-1573.
- Olafsen, J. A. (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* **200**, 223-247.
- Pelczar, M.; Chan, E.C.S. & Krieg, N.R.(1996). Microbiologia. In: *Makron Books*, Vol. 1, pp. 524. São Paulo, SP.
- Piper, R. G.; Mcelwain, I. B.; Orme, L. E.; McCraren J. P., Fowler, L. G. & Leonard, J. R. (1982). Fish Hatchery Management. In *United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service*, 517 pp. Washington, DC, USA.
- 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.
- Rimmer, D. W. & Wiebe, W. J. (1987). Fermentative microbial digestion in the herbivorous fishes. *Fish Biology* **31**, 229–236.
- Ringo, E., Strom, E. & Tabachek, J. A. (1995). Intestinal microbiota of salmonids, a review. *Aquaculture Research* **26**, 773-789.
- Ringo, E. & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microbiota of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* **30**, 73-93.
- Ringo, E. & Olsen, R. E. (1999). The effect of diet on aerobic bacterial microbiota associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology* **86**, 22-28.
- Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T. M. & OLSEN, R. E. (2006a). The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* **37**, 891-897.
- Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S. & Krogdahl, A. (2006b). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), The effect of fish

- meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* **261**, 829-841.
- Ringo, E., Sperstad, S., Kraugerud, O. F. & Krogdahl, A. (2008). Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquaculture Research* **39**, 1087-1100.
- Shiau, S. Y. (1997). Utilization of carbohydrates in warmwater fish-with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* **151**, 79-96.
- Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H. & Takeda, M. (1977). Comparative studies on carbohydrate metabolism of yellowtail and carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **43**, 213-217.
- Smith, L.S. (1989). Digestive functions in teleost fishes. In *Fish nutrition*, 2nd edn, (Halver, J. E., eds), pp. 331-421. San Diego, CA: Academic press.
- Spanggaard, B., Huber, I., 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.
- Stickney, R. R. & Shumway, S. E. (1974). Occurrence of cellulase activity in the stomachs of fish. *Journal of Fish Biology* **6**, 779-790.
- Sugita, H., Kawasaki, J. & Deguchi, Y. (1997). Production of amylase by intestinal microbiota in cultured freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 105-108.
- Tanaka, R., Ootsubo, M., Sawabe, T., Ezur, Y. & Tajima, K. (2004). Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture* **241**, 453-463.
- Yang, G., Bao, B., Peatman, E., Li, H., Huang, L. & Ren, D. (2007). Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish (*Takifugu obscurus*). *Aquaculture* **262**, 183-191.

CONCLUSÕES

Com a utilização de meios de cultura seletivos e não seletivos, foi possível detectar que a tilápia, ao longo de seu trato intestinal, apresentou mais bactérias totais, amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas que o jundiá.

As bactérias totais, degradadoras de carboximetilcelulose, proteína e lipídio encontram-se igualmente distribuídas ao longo do intestino de tilápia. O mesmo foi observado para o jundiá, com as bactérias totais. Este, contudo, apresentou mais bactérias proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas na porção posterior do intestino, onde também foi maior o número de bactérias amilolíticas para a tilápia.

As espécies apresentaram diferenciações entre as contagens bacterianas intestinais em função das fontes de carboidrato das dietas (arroz, milho e mandioca).

A microbiota bacteriana presente na parede intestinal dos peixes foi sensível a dieta administrada, que alterou sua composição. Foi detectada *Fusobacterium* em jundiás alimentados com dietas contendo arroz, e contendo mandioca, dextrina, arroz e milho para tilápia. Foi evidenciada diferenciação da microbiota de jundiá e tilápia, já que foram observadas apenas no primeiro, bactérias da ordem Spirochaetales, comuns nos tratamentos com milho, mandioca e dextrina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo constitui parte de um projeto que objetiva o estudo de carboidratos na nutrição do jundiá e da tilápia do Nilo. O mesmo é composto pelo presente, que visa avaliar o efeito de carboidratos dietéticos na dieta na microbiologia intestinal das espécies; um trabalho de doutorado, cuja abordagem se concentra no estudo do metabolismo de carboidratos amiláceos; e outro trabalho de mestrado, que investiga potenciais efeitos da fibra alimentar sobre a fisiologia intestinal de teleósteos.

Os resultados encontrados neste estudo são de carácter preliminar, tendo em vista a falta de conhecimento da microbiota associada a nutrição, principalmente em espécies nativas brasileiras, como jundiá. Considerando-se a eficácia observada dos meios de cultura formulados na avaliação do crescimento bacteriano, sugere-se a identificação das cepas isoladas por coloração de Gram e caracterização bioquímica em estudos posteriores.

Devido às limitações de cada método, a associação de técnicas tradicionais com moleculares é mais promissora. Para maior esclarecimento da microbiota, pode-se incluir a investigação da população de bactérias não residentes, associadas à digesta, comparando-a com a população residente intestinal.

A fim de selecionar de bactérias que aumentem a degradação de nutrientes da dieta, por exemplo carboidrato, a condução de um teste de patogenicidade das cepas isoladas é essencial para assegurar a inocuidade para os peixes. A seleção, a partir da própria microbiota dos peixes estudados, deve considerar resultados da produção enzimática das cepas isoladas, como amilase, e taxa de crescimento. A otimização do crescimento das bactérias pode ser atingida variando-se diferentes meios de cultura e condições de inóculo.

Para suplementação de dietas com as cepas produtoras selecionadas, deve-se avaliar a viabilidade das bactérias no meio, investigando-se a influência na digestibilidade dos ingredientes para jundiá e tilápia. Finalmente, o estudo pode ser aplicado visando a obtenção de bactérias probióticas que aumentem a absorção de carboidrato pelos peixes cultivados, reduzindo-se efluentes, custos com ração, incrementando índices zootécnicos e possivelmente o sistema imunológico dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- AMANN, R.I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX, R.; KEY, R.; STAHL, D.A. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 614-623, 1992.
- BAIRAGI, A.; GHOSH, K.S.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial microbiota isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, p. 109-121, 2002.
- BURR, G.; GATLIN D.; RICKE S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probióticos in finfish aquaculture. **Journal of the world aquaculture society**. v. 36, p. 425-436, 2005.
- CACECI, T.; HRUBEC, T.C. Histology and ultrastructure of the gut of the Black Mollie (*Poecilia* spp.), a hybrid teleost. **Journal of Morphology**, v. 204, p. 265-280, 1990.
- CAHILL, M.M. Bacterial microbiota of fishes: a review. **Microbial Ecology**, v. 19, p. 21-41, 1990.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109A, p. 213-222, 1994.
- CLEMENTS, K.D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. In: MACKIE, R.I. & WHITE, B.A. (Ed.). **Gastrointestinal Microbiology**, (Gastrointestinal ecosystems and fermentations), Chapman and Hall, New York, NY, USA, 1997. v. 1, p. 156-198.
- COLDEBELLA, I.J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 449-503, 2002.
- DAS, K.M.; TRIPATHI, S.D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture**, v. 92, p. 21-32, 1991.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2002. FAO FishStat plus. Aquaculture Production 1970-2000. Rome, Italy.

FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. No rastro das espécies nativas. **Panorama da Aquicultura**, v. 12, p. 43-49, 2002.

GARCIA-GALLEGO, M., BAZOCO, J.; SUAREZ, M.D.; SANZ, A. Utilization of dietary carbohydrates by fish: a comparative study in eel and trout. **Animal Science**, v. 61, p. 427-436, 1995.

GARGIULO, A.M.; CECCARELLI, P.; DALL'AGLIO, C.; PEDINI, V. Histology and ultrastructure of the gut of the tilapia (*Tilapia* spp.), a Hybrid Teleost. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 27, p. 89-94, 1998.

GAUTHIER, G. F.; LANDIS, S. C. The relationship of ultrastructural and cytological features to absorptive activity in the goldfish intestine. **The Anatomical Record**, v. 172, p. 675-701, 1972.

GIOVANNONI, S. J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature** (London), v. 345, p. 60-63, 1990.

GOMEZ, G.D.; BALCAZAR, J.L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 145-154, 2008.

GRAU, A.; CRESPO, S.; SARASQUETE, M.C; GONZALES DE CANALES, M.L. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning electron microscope study. **Journal of Fish Biology**, v. 41, p. 287-303, 1992.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pices, Pimelodidae)**. 1980. 100 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.

HAGI, T.; TANAKA, D.; IWAMURA, Y.; HOSHINO, T. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 335-346. 2004

HANSEN, G.H.; OLAFSEN, J.A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. **Microbial Ecology**, v. 38, p. 1-26, 1999.

HARPAZ, S.; UNI, Z. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124A, p. 155-160, 1999.

HE, S.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; CAO, Y.; MENG, K.; SHI, P.; YAO, B.; RINGO, E. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **Archive Microbiology**, v. 12, p. 985-994, 2010.

HEIKKINEN, J.; VIELMA, J.; KEMILAINEN, O.; TIROLA, M.; ESKELINEN, P.; KIURU, T.; NAVIA-PALDANIUS, D.; VON WRIGHT, A. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 261, p. 259-268, 2006.

HEMRE, G.I.; LIE, O.; SUNDBY, A. Dietary carbohydrate utilisation in cod (*Gadus morhua*): metabolic responses to feeding and fasting. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 10, p. 455-463, 1993.

HEMRE, G.I.; SANDNES, K.; LIE, O.; TORRISSEN, O.; WAAGBO, R. Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilization. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, p. 149-154, 1995.

HEMRE, G.I.; MOMMSEN, T.P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 175-194, 2002.

HEROLD, M.A.; HUNG, S.S.O.; FYNN-AIKINS, K. Apparent digestibility coefficients of carbohydrates for white sturgeon. **Progressive Fish Culturist**, v. 57, p. 137-140, 1995.

HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, p. 267-283, 1999.

HOVDA, M.B.; LUNESTAD B.T.; FONTANILLAS, R.; ROSNES, J.T. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 272, p. 581-588, 2007.

HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K.F.; ROSSEN, L.; NIELSEN, T.; GRAM, L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 117-132, 2004.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, p. 299-313, 2004.

JANTRAROTAI, W.; SITASIT, P.; JANTRAROTAI, P., VIPUTHANUMAS, T.; SRABUA, P. Protein and energy levels for maximum growth, diet utilization, yield of edible flesh and protein sparing of hybrid *Clarias* catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, p. 281-289, 1998.

JUN-CHENG, L.; JIAN-LIN, L.; TING-TING, W. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenil tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 32, p. 295-303, 2006.

KONO, M, MATSUI, T.; SHIMIZU, C. Decomposing bacteria in digestive tracts of cultured Red Sea bream and Japanese eel. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, p. 305-310, 1987.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G.I.; MOMMSEN, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in post larval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11; p.103-122, 2005.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F. DE A.; COSTA, M. L.; LOSEKANN, M. E.; CORREIA, V.; BOCHI, V. C. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 240-246, 2006.

LEENHOUWERS, J.I.; PELLIKAAN, W.F.; HUIZING, H.F.A.; COOLEN, R.O.M.; VERRETH, J.A.J.; SCHRAMA, J.W. Fermentability of carbohydrates in an in vitro batch culture method using inocula from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Nutrition**, v.14, p.523-532, 2008.

LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J.D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology Biochemistry**, v. 20, p. 293-303, 1999.

LERMAN, L.S.; FISCHER, S.G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, N. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics & Bioengineering**, v. 13, p. 399-423, 1984.

LÉSEL, R.; PÉRINGER, P. Influence of temperature on the bacterial microflora in *Salmo gairdneri* Richardson. *Archiv fur Hydrobiologie*. Stuttgart, v. 93, p. 109-120, 1981.

LESEL, R.; FROMAGEOT, C.; LESEL, M. Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**, v. 54, p. 11-17, 1986.

LIN, Y.; WU, J.; SHIAU, S. Dietary cobalt can promote gastrointestinal bacterial production of vitamin B12 in sufficient amounts to supply growth requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 302, p. 89-93, 2010.

LINDSAY, G.J.H.; HARRIS, J.E. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tracts of fish. **Journal of fish Biology**, v. 16, p. 219-233, 1980.

LUNDSTEDT, L.M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137B, p. 331-339, 2004.

MACHADO, J.H.; CARRATORE, C.R.; FRIZZAS O.G. Desempenho produtivo de alevinos de jundiá (*Rhamdia* sp.) alimentados com diferentes níveis de proteína e energia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12. Goiânia. **Anais...**, UFG, Goiânia. 2002. p. 89.

McPHEARSON, R.M.; DePAOLA, A.; ZYWNO, S.B.; MOTES Jr, M.L.; GUARINO, A.M. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 99, p. 203-211, 1991.

- MELO, J.F.B.; RADUNZ NETO, J.; DA SILVA, J.H.S.; TROMBETTA, C.G. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 323-327, 2002.
- MELO, J.F.B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- MERRIFIELD, D.L.; BURNARD, D.; BRADLEY, G.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 40, p. 1064-1072, 2009.
- MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, 12, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1997. 29 p.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D.M. Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p. 331-343, 2004.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D.M. Estimation of jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**, Piracicaba, Braz., v. 62, n. 4, p. 401-405, 2005.
- MINAMI, Z.; KAJINTA, M.; HIBINO S. Studies on the utilization of petro-yeast as diet of freshwater fish. I. The distribution of chitin-decomposing bacteria in digestive tracts. **Nippon Suisan Gakkaishi**; v. 38, p. 1013-1019, 1972.
- MONTES-GIRAO, P.J.; FRACALOSSO, D.M. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, p. 388-396, 2006.
- MORO, G.V.; CAMILO, R.Y.; MORAES, G.; FRACALOSSO, D.M. Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities

and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*.

Aquaculture Research, v. 41, p. 394-400, 2010.

MUIR, J., VAN RIJN, J., HARGREAVES, J. Production in intensive and recycle systems. In: Beveridge, M.C.M., McAndrew, B.J. (Ed.), **Tilapias: Biology and Exploitation**. Kluwer Academic Publishing, Great Britain, 2000, p. 405-445.

MURRAY, H.M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. A comparative histological study of the post-gastric alimentary canal from three species of pleuronectid, the Atlantic halibut, the yellowtail Bounder and the winter flounder. **Journal of fish Biology**, v. 48, p. 187-206, 1996.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59; p. 695-700, 1993.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553-1573, 2010.

OLAFSEN, J.A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. **Aquaculture**, v. 200, p. 223-247, 2001.

OLIVEIRA FILHO, P.R.; FRACALLOSSI, D.M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Visçosa, v. 35, n. 4, p. 1581-1587, 2006.

PÁRRIZAS, M.; PLANAS, P.; PLISETSKAYA, E.M.; GUTIÉRREZ, J. Insulin receptor and its tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 1944– 1950, 1994a.

PÁRRIZAS, M.; BAÑOS, N.; BARÓ, J.; PLANAS, J.; GUTIÉRREZ, J. Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. **Regulatory Peptides**, v. 53, p. 211-222, 1994b.

PATT, D. E.; PATT, G. R. Comparative vertebrate histology. In: HARPER and ROW, Publishers, New York, NY, USA, 1969, p. 155.

PÉRES, A., CAHU, C.L., ZAMBONINO INFANTE, J.L., LE GALL, M.M.; QUAZUGUEL, P. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, p. 237-242, 1996.

POND, M.J.; STONE, D.M.; ALDERMAN, D.J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 261, p. 194-203, 2006.

PREJS, A.; BLASZCYK, M. Relationships between food and cellulase activity in freshwater fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 11, p. 447-452, 1977.

RIBEIRO, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; CAHU, C.; DINIS, M.T. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 27, p. 61-69, 2002.

RIMMER, D.W.; WIEBE, W.J. Fermentative microbial digestion in the herbivorous fishes. **Fish Biology**, v. 31, p. 229-236, 1987.

RINGO, E.; STROM, E.; TABACHEK, J.A. Intestinal microbiota of salmonids, a review. **Aquaculture Research**, v. 26, p. 773-789, 1995.

RINGO, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177-203, 1998.

RINGO, E., BIRKBECK, T.H. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 73-93, 1999.

RINGO, E.; OLSEN, R.E. The effect of diet on aerobic bacterial microbiota associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 22-28, 1999.

RINGO, E.; BENDIKSEN, H.R.; WESMAJERVI, M.S.; OLSEN, R.E., JANSEN, P.A.; MIKKELSEN, H. Lactic acid bacteria associated with digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 317-322, 2000.

RINGO, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; MAYHEW, T.M.; OLSEN, R.E. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 891-897, 2006a.

RINGO, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; REFSTIE, S.; KROGDAHL, A. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, v. 261, p. 829-841, 2006b.

RINGO, E.; SALINAS, I.; OLSEN, R.E.; NYHAUG, A.; MYKLEBUST, R.; MAYHEW, T.M. Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. **Cell and Tissue Research**, v. 328, p. 109-116, 2007.

RINGO, E.; SPERSTAD, S.; KRAUGERUD, O.F.; KROGDAHL, A. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1087-1100, 2008.

RINGO, E.; LOVMO, L.; KRISTIENSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 451-467, 2010.

RUST, M.B. Nutritional Physiology. In: Halver, J.E.; Hardy, R.W. **Fish nutrition**. Academic Press, Florida, USA, 2002. p. 368-446.

SAHA, A.K.; RAY, A.K. Cellulase activity in rohu fingerlings. **Aquaculture International**, v. 6, p. 281-291, 1998.

SAHA, S.; ROY, R.N.; SEM, S.K.; RAY, A.K. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 380-388, 2006.

SAKATA, T. Microbiota in the digestive tract of fish and shellfish. In: Lesel, R. **Microbiology in Poecilotherms**. Oxford: Elsevier, 1990. p. 171-176.

SALHI, M.; BESSONART, M.; CHEDIAK, G. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 435-444, 2004.

SHIAU, S.Y. Utilization of carbohydrates in warmwater fish-with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*. **Aquaculture**, v. 151, p. 79-96, 1997.

SKRODENTYTÉ-ARBACIAUSKIENÉ, V.; SRUOGA, A.; BUTKAUSKAS, D. Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. **Fisheries Science**, v. 72, p. 597-602, 2006.

SKRODENTYTÉ-ARBACIAUSKIENÉ, V.: Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus* L. **Fisheries Science**, v. 73, p. 964-966, 2007.

STICKNEY, R.R.; SHUMWAY, S.E. Occurrence of cellulase activity in the stomachs of fish. **Journal of Fish Biology**, v. 6, p. 779-790, 1974.

SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12 - producing ability of the intestinal bacteria isolated From tilapia and channel catfish. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 56, p. 701, 1990.

SUGITA, H.; SHIBUYA, K.; SHIMOOKA, H.; DEGUCHI, Y. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. **Aquaculture**, v. 145, p. 195-203, 1996.

SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; DEGUCHI, Y. Production of amylase by intestinal microbiota in cultured freshwater fish. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 105-108, 1997.

TAKEUCHI, T. Digestion and nutrition of fish. In: ITAZAWA, Y. e HANYU, I. (Ed.). **Fish Physiology**. Tokyo: Koseisha Koseikaku (in Japanese), 1991, p. 67-101.

TANAKA, R.; OOTSUBO, M.; SAWABE, T.; EZUR, Y.; TAJIMA, K. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. **Aquaculture**, v. 241, p. 453-463, 2004.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T.; SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.

TRUST, T.J.; BULL L.M.; CURRIE, B.R.; BUCKLEY, J.T. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microbiota of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, p. 1174-1179, 1979.

WALTON, M.J.; COWEY, C.B. Aspects of intermediary metabolism in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 73B, p. 59-79, 1982.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature** (London), v. 344, p. 63-65, 1990.

WILSON, R.P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, p. 67-80. 1994.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

YANG, G.; BAO, B.; PEATMAN, E.; LI, H.; HUANG, L.; REN, D. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. **Aquaculture**, v. 262, p. 183-191, 2007.