

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DANIELA ROMANI BONOTTO

POTENCIAL FERMENTATIVO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA
MICROBIOTA FERMENTADORA INTESTINAL DE CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*)

*(In vitro fermentative potential and molecular characterization of the
fermenting intestinal microbiota of the grass carp (Ctenopharyngodon idella))*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2015

DANIELA ROMANI BONOTTO

**POTENCIAL FERMENTATIVO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DA MICROBIOTA FERMENTADORA INTESTINAL DE
CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

*(In vitro fermentative potential and molecular characterization of the fermenting
intestinal microbiota of the grass carp (Ctenopharyngodon idella))*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel
França Madeira

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	viii
RESUMO GERAL	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 INTRODUÇÃO.....	2
2.2 ANATOMIA E HÁBITO ALIMENTAR.....	2
2.3 MICROBIOTA GASTRINTESTINAL.....	4
2.3.1 Utilização de carboidratos	9
2.3.2 Enzimas digestivas de origem endógena e bacteriana	12
2.3.3 Ácidos graxos de cadeia curta	14
2.4 SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	15
2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS.....	17
CAPÍTULO 3	
3 FERMENTABILIDADE DE CARBOIDRATOS PELA MICROBIOTA INTESTINAL DE CARPA CAPIM (<i>CTENOPHARYNGODON IDELLA</i>) EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> (<i>BATCH</i>)	20
Resumo.....	20
Abstract.....	22
3.1 INTRODUÇÃO.....	24
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.2.1 Descrição resumida dos experimentos realizados	26
3.2.2 Coleta dos animais	27

3.2.3 Preparo do meio de cultivo anaeróbio.....	29
3.2.4 Preparo das fontes de carbono.....	30
3.2.5 Retirada, processamento do conteúdo intestinal sob anaerobiose e inoculação dos frascos de fermentação.....	32
3.2.6 Coleta do conteúdo fermentado.....	33
3.2.7 Métodos analíticos.....	34
3.2.7.1 Análises bromatológicas.....	34
3.2.7.2 Determinação de pH.....	34
3.2.7.3 Determinação do N-NH ₃	34
3.2.7.4 Determinação de AGCC.....	35
3.2.8 Análises moleculares.....	35
3.2.8.1 Extração de DNA.....	35
3.2.8.2 Amplificação do gene RNAr 16S.....	36
3.2.8.3 Clonagem gênica.....	37
3.2.8.4 Extração de DNA plasmidial (Miniprep).....	39
3.2.8.5 Reação de sequenciamento.....	40
3.2.8.6 Análise das sequências de RNAr 16S.....	41
3.2.9 Análise estatística.....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.3.1 Análises bromatológicas dos ingredientes.....	42
3.3.2 Análises de pH.....	42
3.3.3 Análises de N-NH ₃	47
3.3.4 Análises de AGCC.....	51
3.3.5 Análises moleculares.....	57
3.3.5.1 Amplificação do gene RNAr 16S.....	57
3.3.5.2 Clonagem gênica e identificação molecular dos clones.....	57
3.4 CONCLUSÃO.....	68
CAPÍTULO 4	
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	82

Para os meus amores, Helena e Valtuir.

vi

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que o homem, em sua insignificante sabedoria, desvende alguns dos mistérios da vida.

Ao meu orientador, Humberto Madeira, pela orientação e por confiar a mim esse projeto de pesquisa empolgante e desafiador.

À PUCPR, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu marido, Valtuir, pela paciência, amor e incentivo.

Aos familiares, Lorena, Maria, Valtuir Ângelo (*in memoriam*), Valtismari e Andreza por cuidarem da minha filha sempre que precisei me ausentar.

À Marlise Mauerwerk, pela amizade e ajuda incondicional em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas de mestrado, Samara, Rafael e Edegar pela amizade e companheirismo.

À Adrielle Schoemberger, pela amizade e por me ajudar a realizar as análises bromatológicas.

Aos colegas de trabalho Antônio Raimundi e Elvis Leal, por serem prestativos em todos os momentos em que precisei.

Aos alunos de iniciação científica oficiais, André Heisler, Dâmaris Marios, Giovanna Cesaro e William Oliveira e aos que participaram desse trabalho de forma voluntária, mesmo que por algumas horas, Ariane Paschoal, Talita Melo, Eloisa Canziani, Elori Mieko, Elisa Andrade e Camila Lopes. Agradeço pela ajuda e amizade.

Ao professor Saulo Weber, pelo auxílio com a análise estatística.

À professora Ana Paula Baldan e toda a equipe do LAPEP pelo auxílio na captura dos animais.

Aos professores Cristina Sotomaior, Edvaldo Rosa e Leonardo Cruz, por participarem da banca avaliadora e pelas relevantes sugestões para a melhoria deste trabalho.

Ao professor Ives Bueno (USP Pirassununga) e à Priscila Maldonado, pela receptividade e realização das análises de ácidos graxos.

Aos demais professores do PPGCA, pelos ensinamentos compartilhados.

A todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e os objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 traz a revisão da literatura no tema desta dissertação.

O capítulo 3 apresenta um artigo a ser publicado em periódico científico.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As citações feitas em todos os capítulos encontram-se referenciadas em lista no final da dissertação.

RESUMO GERAL

A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) consome um volume elevado de matéria vegetal e tem sido utilizada para controle de plantas aquáticas. Parte da celulose contida nestes vegetais acredita-se ser degradada por bactérias intestinais. Fontes alimentares constituídas de carboidratos, ao serem metabolizadas em ambiente anaeróbio, geram produtos secundários como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que fornecem energia e carbono necessários para a manutenção do metabolismo do animal. A identificação das bactérias que habitam o trato intestinal desses animais é fundamental para a compreensão do processo fermentativo, e para isso o uso de ferramentas de biologia molecular, como a utilização de sequências do RNAr 16S, é indicado. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade fermentativa *in vitro* de diferentes fontes de carboidrato pela microbiota intestinal do peixe carpa capim e realizar a caracterização molecular das bactérias presentes após a fermentação *in vitro*. Nove espécimes de carpa capim foram coletados de viveiros escavados do setor de piscicultura da PUCPR (LAPEP). Os animais foram eutanasiados e seus intestinos foram retirados. O conteúdo intestinal foi incubado em meio de cultivo anaeróbio contendo feno de alfafa, fubá de milho e glicose como fontes de carbono. Os valores de pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram medidos em 0h, 8h, 12h, 24h e 48h, sob diferentes temperaturas de incubação (18 °C, 26 °C e 37 °C). As análises de AGCC foram realizadas para os tempos 0h, 8h e 48h, a partir de amostras incubadas a 26 °C. Após 48h de incubação, foi extraído o DNA do conteúdo dos frascos de fermentação, seguido por amplificação por PCR do gene RNAr 16S utilizando os primers 27F e 1492R. O produto de PCR foi clonado e o DNA plasmidial dos clones foi extraído por miniprep e seus fragmentos foram sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas presentes nos bancos de dados RDP e GenBank. O meio apresentou acidificação de 6,8 para 6,6 para no tratamento com glicose; de 6,9 para 5,9 com fubá e manteve-se inalterado no tratamento de feno (6,9). A concentração de N-NH₃ observada nos tempos 0h e 48h variou de 2,2 mM a 3,3mM; de 2,4 mM a 2,8mM e de 2,4 mM a 3,9mM nos tratamentos contendo glicose, fubá e feno, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as concentrações de N-NH₃ e as diferentes temperaturas de incubação. A concentração total de AGCC mensurada nos tempos 0h e 48h de incubação na temperatura de 26 °C foi de 8, mM a 28 mM para glicose, 3,7 mM a 63,4 mM para fubá e de 4,6 mM a 18,6 mM para feno. Os filos mais abundantes identificados nos tratamentos de glicose e feno incubados a 26 °C foram, em ordem decrescente, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria. Entre os gêneros bacterianos identificados, os mais abundantes foram *Eubacterium*, *Pseudomonas* e *Clostridium* na amostra contendo glicose e *Cetobacterium*, *Clostridium* e *Anaerosinus* na amostra contendo feno. As espécies bacterianas identificadas foram *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium* sp., *Clostridium butyricum* e *Pseudomonas* sp. no tratamento com glicose e *Clostridium* sp., *Robinsoniella peorienses*, *Cetobacterium somerae* e *Hafnia alvei* no tratamento de feno. Os resultados encontrados demonstram que a microbiota intestinal de carpa capim possui capacidade significativa de fermentar carboidratos, considerando os dados de pH, AGCC e produção de gás, quando comparados com valores obtidos para outros peixes. A caracterização molecular predominante de microrganismos anaeróbios demonstra que as condições de anaerobiose foram mantidas durante o experimento. A diversidade microbiana encontrada, bem como os parâmetros de

fermentação sugerem que a dieta exerceu influência sobre a microbiota intestinal e consequentemente sobre o potencial fermentativo do conteúdo do intestino de carpa capim.

Palavras-chave: Carpa capim. Carboidrato. Fermentação *in vitro*. RNAr 16S.

ABSTRACT

The grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) ingests large amounts of plant material and has been used to control aquatic plants. Part of the cellulose present in the plants is believed to be degraded by intestinal bacteria. Dietary sources comprised of carbohydrates when metabolized in an anaerobic environment generate short chain fatty acids (SCFA) which provide energy and carbon necessary for the maintenance of the animal's metabolism. The identification of bacteria that inhabit the intestinal tract of animals is fundamental to the understanding of the fermentation process and the use of molecular biology tools such as the 16S rRNA sequences is recommended. This work aimed to evaluate the in vitro fermentative ability of the intestinal microbiota of the grass carp on different sources of carbohydrates and to characterize the bacteria present following in vitro fermentation. Nine grass carp specimens were collected from excavated ponds located in the fish farm of PUCPR (LAPEP). Animals were euthanized and their intestines were removed. The intestinal contents were incubated in anaerobic culture medium containing either alfalfa hay, corn meal and glucose as carbon sources. The pH and ammonia (NH₃) values were measured at 0h, 8h, 12h, 24h and 48h under different incubation temperatures (18°C, 26°C and 37°C). The analysis of SCFA were performed on samples from incubation times of 0h, 8h and 48h and at 26°C. After 48 h of incubation, DNA was extracted from the contents of the fermentation flasks, followed by PCR amplification of the 16S rRNA gene using primers 27F and 1492R. The PCR product was cloned, the plasmid DNA was extracted by miniprep and fragments were sequenced. Sequences were compared to those present in GenBank and RDP databases. Upon incubation, media suffered acidification, with pH values reducing from 6.8 to 6.6 in the glucose treatment; from 6.9 to 5.9 in the cornmeal treatment and remained unchanged in the hay treatment (6,9). The concentration of NH₃ at 0h and 48h ranged from 2.2 mM to 3.3 mm; 2.4 mM to 2.4 mM; and 2.8mM to 3.9mM in glucose, corn and hay treatments, respectively. There was no significant difference between the N-NH₃ concentrations in the different incubation temperatures. The concentration values of total SCFA measured at 0h and 48h at 26 ° C was 8 mM and 28 mM under glucose, 3.7 mM and 63.4 mM under cornmeal, and 4.6 mM and 18, 6 mM under alfalafa hay. The most abundant phyla identified in glucose and hay treatments incubated at 26°C were, in descending order, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes and Fusobacterium. Among the identified bacterial genera, the most abundant were *Eubacterium*, *Pseudomonas* and *Clostridium* in the glucose treatment, and *Cetobacterium*, *Clostridium* and *Anaerosinus* in hay. Identified bacterial species were *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium* sp., *Clostridium butyricum* and *Pseudomonas* sp. in the treatment with glucose, and *Clostridium* sp., *Robinsoniella peorienses*, *Cetobacterium somerae* and *Hafnia alvei* in the treatment with hay. The results show that the intestinal microbiota of grass carp has significant capacity to ferment carbohydrates, when pH, SCFA and gas production data were compared to values obtained for other fish. The molecular characterization of predominantly anaerobic microorganisms shows that anaerobic conditions were maintained during the experiment. The microbial diversity observed under the various treatments as well as the values of the fermentation parameters suggest that the diet influence the intestinal microbiota and hence the fermentation potential of the grass carp gut contents.

Keywords: Grass Carp, Carbohydrate, *in vitro* Fermentation, 16S rRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	ácido graxo de cadeia curta
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
C	carbono
C ₂	ácido acético
C ₃	ácido propiônico
C ₄	ácido butírico
CH ₄	metano
CI	comprimento do intestino
CP	comprimento padrão
CO ₂	dióxido de carbono
CZ	cinzas
ddNTP	didesoxinucleotídeo trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FeSO ₄	sulfato ferroso
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
H ₂	gás hidrogênio
H ₂ O	água
HCl	ácido clorídrico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactosídeo
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio
LAPEP	Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
LB	Luria Bertani

MgSO ₄	sulfato de magnésio
MnCl ₂	cloreto de manganês
MS	Matéria Seca
N	nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
Na ₂ MoO ₄	molibdato de sódio
NH ₄ Cl	cloreto de amônia
N-NH ₃	nitrogênio amoniacal
Na ₂ S	sulfeto de sódio
NiCl ₂	cloreto de níquel
O ₂	oxigênio
P	peso
pb	pares de bases
PB	Proteína Bruta
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	solução salina fosfatada
PCR	reação em cadeia da polimerase
RDP	Ribossomal Database Project
RNA	ácido ribonucleico
RNAr 16S	RNA ribossomal 16S
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris Borato EDTA
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo
ZnCl ₂	cloreto de zinco

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Diversidade de filos bacterianos identificados por métodos moleculares por diferentes autores encontrados no conteúdo intestinal de carpa capim.....	07
Tabela 2. Componentes da solução basal.....	30
Tabela 3. Componentes da reação de PCR para amplificação do gene RNAr 16S e suas respectivas concentrações.....	37
Tabela 4. Porcentagem de matéria seca (MS), cinzas (CZ), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e proteína bruta (PB) de amostras de feno de alfafa e fubá.....	42
Tabela 5. Valores médios de pH entre os tratamentos glicose, fubá e feno de alfafa, agrupando-se todas as temperaturas e todos os tempos de incubação.....	45
Tabela 6. Valores de pH de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, em função do tempo, agrupando-se as diferentes temperaturas de incubação.....	46
Tabela 7. Valores de pH de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, entre diferentes temperaturas, agrupando-se os diferentes tempos de incubação.....	46
Tabela 8. Concentrações de N-NH ₃ (mg/100mL) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa	

	capim, em função do tempo, agrupando-se as diferentes temperaturas de incubação.....	50
Tabela 9.	Concentrações de N-NH ₃ (mg/100mL) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, entre diferentes temperaturas, agrupando-se os diferentes tempos de incubação.....	51
Tabela 10.	Produção de gás (mL) nos frascos de fermentação contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim na temperatura de 37 °C no decorrer do tempo de incubação de 48h.....	54
Tabela 11.	Concentrações de AGCC (mM) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, na temperatura de 26 °C, entre diferentes tratamentos e tempos de incubação.....	55
Tabela 12.	Representação do número de sequências válidas para cada tratamento e identificação encontrada por categoria.....	59
Tabela 13.	Classificação das bactérias identificadas com uso da sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra contendo glicose após 48h de incubação.....	65
Tabela 14.	Classificação das bactérias identificadas com uso da sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra contendo feno de alfafa após 48h de incubação.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo do estabelecimento da fermentação anaeróbia <i>in vitro</i> . a) incisão ventral, b) coleta do conteúdo intestinal sob CO ₂ , c) frascos contendo dietas de carboidrato + solução basal, d) frascos contendo conteúdo intestinal + dieta + solução basal, incubados em banho maria; e) potenciômetro utilizado para análise de pH, f) espectrofotômetro utilizado para análise de N-NH ₃	27
Figura 2. Coleta dos animais com auxílio de rede de arrasto no setor de piscicultura da PUCPR (LAPEP).....	28
Figura 3. Biometria dos animais após eutanásia com benzocaína. a) verificação do peso do animal, b) verificação do CP e CT com uso de ictiômetro.....	28
Figura 4. Preparo da solução basal. a) frasco contendo meio sob adição de CO ₂ sobre placa aquecida, b) frascos tipo penicilina de 50 mL contendo meio saturado com CO ₂ e vedado com rolha de borracha e lacre de alumínio.....	29
Figura 5. Preparo das fontes de carbono. a) frascos contendo solução basal e frascos contendo as dietas autoclavadas, b) frascos contendo solução basal e dieta saturadas com CO ₂ , c) adição de NH ₄ Cl e agente redutor com auxílio de seringa e agulha aos frascos contendo dieta e solução basal, d) incubação em banho maria a 37 °C para redução do O ₂	31
Figura 6. Retirada e processamento do conteúdo intestinal. a) corte ventral com auxílio de material cirúrgico estéril, b) trato intestinal, c) comprimento do intestino x comprimento do animal d) inóculo saturado com CO ₂	32
Figura 7. Extração de alíquotas do material fermentado. a) uso de seringa e agulha para coleta do fermentado; b) análise de pH.....	33

Figura 8.	Placa de petri (LB + IPTG + X-Gal + Amp) contendo células bacterianas clonadas.....	39
Figura 9.	Confirmação das células transformadas por repique em placa de petri numerada, contendo ágar LB + IPTG + X-Gal.....	39
Figura 10.	Variação do pH no decorrer de 48h de fermentação, de amostras de diferentes fontes de carboidratos incubadas com conteúdo intestinal de carpa capim a 18 °C (a), a 26 °C (b) e a 37 °C (c).....	44
Figura 11.	Concentração de N-NH ₃ no decorrer de 48h de fermentação de amostras de diferentes fontes de carboidratos incubadas com conteúdo intestinal de carpa capim a 18 °C (a), a 26 °C (b) e a 37 °C (c).....	49
Figura 12.	Proporção total de ácidos graxos produzidos no tratamento contendo glicose (a), fubá (b) e feno de alfafa (c), após 48h de incubação.	54
Figura 13.	Gel de agarose contendo fragmentos do gene RNAr 16S, amplificados por PCR a partir do DNA total de amostras de frascos de fermentação com glicose, fubá e feno de alfafa após 48h de incubação.....	57
Figura 14.	Gel de agarose contendo DNA plasmidial extraído de células de <i>E. coli</i> transformadas com fragmentos de DNA, produto de amplificação obtido a partir do DNA total de amostras dos frascos de fermentação contendo glicose e feno.....	58
Figura 15.	Representação dos filamentos bacterianos encontrados nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, após 48h de incubação.....	59
Figura 16.	Representação dos filamentos bacterianos encontrados nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alfafa após 48h de incubação.....	60

Figura 17. Representação dos gêneros bacterianos identificados nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, após 48h de incubação.....	62
Figura 18. Representação dos gêneros bacterianos identificados nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alfafa, após 48h de incubação.....	63
Figura 19. Distribuição das espécies bacterianas presentes nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, inoculados com conteúdo intestinal de carpa capim, após 48h de incubação.....	64
Figura 20. Distribuição das espécies bacterianas presentes nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alfafa, inoculados com conteúdo intestinal de carpa capim, após 48h de incubação.....	64

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) pertence à família Cyprinidae, originária da China e foi introduzida em mais de cem países do mundo (Song et al., 2009). É uma espécie que vem mostrando resultados satisfatórios em viveiros de piscicultura, apresentando excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para a pesca esportiva quanto para a alimentação direta, tendo se tornado o terceiro organismo aquático mais produzido no mundo em 2002, e a espécie mais cultivada na China.

A carpa capim possui hábito alimentar herbívoro com elevada capacidade em consumir material vegetal, sendo largamente utilizada no controle de plantas aquáticas. Como a carpa capim não possui a capacidade de digerir celulose presente nas células vegetais, tal função precisa ser desempenhada pelas bactérias do trato digestório.

A população microbiana presente no trato intestinal de peixes em geral é complexa e dinâmica, derivada do ambiente aquático, solo e sedimento circundante, além dos microrganismos obtidos através da dieta. Essa simbiose possui um importante papel na nutrição e saúde do animal.

Os carboidratos representam uma fonte de energia de baixo custo na dieta de peixes, servindo como precursores de aminoácidos não essenciais e ácidos nucleicos, necessários ao crescimento animal. No entanto, a concentração de carboidratos tolerados por cada espécie deve ser considerada.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade fermentativa da microbiota do conteúdo intestinal de carpa capim e realizar a caracterização molecular da comunidade bacteriana presente no processo fermentativo.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

A população microbiana presente no trato intestinal de peixes é complexa e dinâmica, derivada do ambiente aquático, solo e sedimentos circundantes, além dos microrganismos obtidos através da dieta. Essa comunidade possui um importante papel na nutrição e saúde do animal (Nayak, 2010).

Estudos sobre a caracterização dessa microbiota e sua relação com a degradação de alimentos e geração de energia através de produtos metabolizados para a nutrição do hospedeiro vêm crescendo (Cahill, 1990; Krogh et al., 2005; Nayak, 2010; Han et al., 2010; Tian et al., 2010; Ni et al., 2012; Wu et al., 2012; Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013; Li et al., 2014; Wang et al., 2014a). No entanto, há ainda muito a ser compreendido sobre essas associações a fim de estabelecerem-se condições adequadas de manipulação, visando à utilização de produtos metabolizados por essa microbiota e sua contribuição à nutrição de peixes.

Assim, justifica-se o desenvolvimento de estudos que visem a caracterização da microbiota intestinal de peixes para melhor esclarecimento sobre a interação estabelecida entre microbiota intestinal de peixes e seu hospedeiro.

2.2 ANATOMIA E HÁBITO ALIMENTAR

A carpa capim é um peixe herbívoro, mas durante seus primeiros estágios de vida se alimenta de rotíferos e crustáceos, além de algumas espécies de algas. Ao atingir cerca de 27 mm de comprimento, o alimento predominante passa a ser plantas macrófitas e, a partir desse estágio, o consumo de alimento animal torna-se insignificante e a carpa passa a ter uma dieta quase que exclusivamente vegetal. Esse peixe apresenta preferência por macrófitas que contenham alta concentração de nitrogênio, baixa relação de carbono: nitrogênio (C:N) e baixa concentração de matéria seca (Dorenbosch e Bakker, 2011).

Essa espécie pode chegar a pesar cerca de 30 kg a 36 kg e atinge sua maturidade com aproximadamente quatro anos de vida ou o peso de 4 kg a 5 kg. Crescem cerca de 9 cm a 10 cm por ano e ganham cerca de 1kg de peso no mesmo período de tempo. A alimentação da carpa capim é estimulada pela temperatura da água, sendo que o animal passa a ingerir alimento em temperaturas acima de 8 °C e atingem seu ápice alimentar quando a temperatura da água encontra-se entre 20 °C e 26 °C, conforme dados revisados por Chilton e Muoneke (1992).

A carpa capim possui dentes faringianos especializados em rasgar e triturar vegetais. No entanto, a digestão desses vegetais é incompleta, sendo 60 a 70% das plantas aquáticas digeridas e o restante eliminado nas fezes, sem apresentar, muitas vezes, sinais visíveis de digestão (Hickling, 1966). Essa espécie não possui estômago e o trato digestório é formado por um longo tubo com aproximadamente o dobro do comprimento corpóreo do animal em sua fase adulta (Hickling, 1966; Du et al., 2009).

Li et al. (2014) observaram que a permanência da forrageira capim Sudão (*Sorghum sudanense*) no intestino de adultos de carpa capim, mantidos em água com temperatura de 25 °C, variou de 8h a 10 h, quando alimentados exclusivamente com a forrageira. Além disso, os autores encontraram resíduos vegetais não digeridos nas fezes dos animais. Esses fatos sugerem que o tempo de permanência do alimento de origem vegetal é curto e que, por essa razão, a utilização da celulose pode não ser significativa.

Ao analisarem o consumo e evacuação de dietas formuladas para juvenis de carpa capim contendo diferentes concentrações de lipídios (6% e 10%) Du et al. (2009) observaram que o tempo de passagem do alimento pelo trato intestinal é de 12 horas, tempo considerado curto em comparação a peixes onívoros e carnívoros, cujo tempo de evacuação pode exceder 24 horas.

Entre os peixes, poucas espécies possuem câmaras de fermentação especializadas no trato digestivo, mas, mesmo sem esse aparato, esses animais abrigam endossimbiontes e podem apresentar concentrações consideráveis de ácidos graxos voláteis, sugerindo que a retenção do alimento no intestino é suficiente para permitir fermentação (Clements, 1997).

Apesar da retenção do alimento não ser comparativamente tão longa, a presença de ácidos graxos voláteis no trato gastrintestinal (seção 2.3.4) sugere que a utilização de fibra vegetal pode ser uma alternativa na alimentação de carpa capim.

A determinação do potencial fermentativo da microbiota intestinal desse peixe, portanto, faz-se necessária.

2.3 MICROBIOTA GASTRINTESTINAL

O trato gastrintestinal de peixes é colonizado por microrganismos já no estágio larval e as bactérias envolvidas nesse processo podem criar um habitat favorável ao seu desenvolvimento através da modulação de genes do intestino, prevenindo, desta forma, a invasão de outras bactérias que venham a constituir esse ecossistema. Esse mecanismo utilizado no estabelecimento da microbiota normal ajuda a manter a saúde do hospedeiro, promovendo uma resistência à colonização de microrganismos invasores (revisado por Gómez e Balcázar, 2008).

Estudo utilizando gnotobióticos de zebrafish (*Danio rerio*) identificou 212 genes que são regulados pela microbiota intestinal, destes, 15 foram relacionados com o aumento da proliferação epitelial, como por exemplo, o gene ribonucleotídeo redutase subunidade M2 (*Rrm2*) e antígeno nuclear de proliferação celular (*Pcna*). Além desses, foram identificados genes envolvidos com a resposta imune inata (proteína C reativa (*Crp*) e angiogenina 4 (*Ang4*), entre outros) e com o metabolismo de nutrientes, como por exemplo, a modulação do metabolismo do colesterol (apolipoproteína B (*ApoB*)) (Rawls et al., 2004).

O trabalho de revisão sobre a fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal de humanos, realizado por Hugenholtz et al. (2013), aponta que os microrganismos desempenham um papel importante no metabolismo, como por exemplo, na utilização de energia e também na manutenção da saúde do hospedeiro, contribuindo com o sistema imune. Disfunções no metabolismo ou no sistema imune podem alterar o desempenho desses microrganismos em fermentar os alimentos, podendo ocasionar obesidade.

Clements (1997) apontou que a diversidade da microbiota intestinal de peixes varia de acordo com a espécie estudada e que a contribuição dos microrganismos para a nutrição do animal ainda não estava esclarecida. Apesar de pesquisas relativas à microbiota intestinal de peixes das últimas décadas terem contribuído para o melhor entendimento dessa relação simbiótica (German, 2009; Day et al., 2011, Zhou et al.,

2013), a afirmação de Clements (1997) de que a real contribuição da microbiota para a nutrição do animal é pouco conhecida continua verdadeira.

O ecossistema microbiano intestinal é composto por bactérias, fungos, protozoários e vírus e essa colonização pode causar doenças no hospedeiro (Reyes et al., 2010). Em contraste, a população bacteriana constitui o principal grupo a colonizar o trato intestinal de peixes, apresentando-se nas seguintes formas: aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, conforme Nayak (2010). Na porção posterior do intestino da espécie de peixe herbívoro *Odax cyanomelasa*, a densidade celular bacteriana foi estimada em 5×10^8 células por peso úmido de conteúdo intestinal (Clements, 1997). Em carpa capim, a densidade populacional de bactérias anaeróbias do trato intestinal foi estimada entre 6×10^4 a 4×10^8 células por grama de conteúdo intestinal (Trust et al., 1979). A população bacteriana pode chegar a uma densidade de 10^{11} células por grama do conteúdo intestinal, na porção do intestino grosso em humanos (Walter e Ley, 2011)

Segundo McFarland (2000), as três principais funções da população microbiana do intestino animal são 1) resistência à colonização por microrganismos patogênicos; 2) contribuição nutricional; e 3) imunomodulação do hospedeiro. Em peixes, o acúmulo de informações acerca da contribuição nutricional da microbiota intestinal tem mostrado que alterações na dieta, em geral, seja com menor ou maior concentração de carboidratos não influenciam a contagem total de bactérias aeróbias ou aeróbias facultativas, mas a distribuição de espécies pode ser significativamente alterada, como no caso de salmonídeos (Ringo e Olsen, 1999).

A microbiota gastrintestinal é uma mistura de espécies, composta por organismos que residem neste local (comensais) e as que transitam por ele, e a associação e competição que ocorre dentro ou entre esses grupos determinam a estabilidade e composição da população microbiana (Hungenholtz et al., 2013).

A composição da comunidade bacteriana de carpa capim é instável, sendo modificada durante os diferentes estágios de vida do animal. Análise da população microbiana nas fases iniciais de vida (ovo e larva) sugere que a colonização bacteriana ocorre gradativamente (em cada etapa de desenvolvimento) e se torna estável apenas após 68 dias da eclosão. A larva, ao iniciar a ingestão de alimento, passa a apresentar gêneros bacterianos que são predominantemente encontrados na

água, sugerindo que esta possui uma grande influência na formação da microbiota desta espécie de peixe (Wang et al., 2014b).

Cahill (1990), ao realizar um levantamento de dados sobre a microbiota intestinal bacteriana de peixes, também indicou que a microbiota presente no conteúdo intestinal de diversas espécies de peixes pode ser influenciada pelo ambiente no qual o animal habita, como por exemplo, rios, lagos e tanques de piscicultura. Comparando a comunidade bacteriana de carpa capim de ambiente natural com aquela de tanques de piscicultura, Ni et al. (2012) encontraram diferenças significativas na população residente entre os peixes de cada habitat, havendo uma diminuição considerável da diversidade microbiana nos animais que vivem em piscicultura, sugerindo que o ambiente externo pode modificar a microbiota intestinal.

Em contraste, análises comparativas da diversidade bacteriana do conteúdo intestinal de carpa capim, sedimento, água, ração comercial e fonte vegetal (*Phragmites australis*), realizada por Han et al. (2010) demonstraram que a microbiota intestinal nativa de carpa é distinta da encontrada no meio ambiente (água e sedimento), mas semelhante à encontrada na dieta (ração e fonte vegetal) ingerida por essa espécie de peixe.

Sendo assim, um melhor entendimento da variação na composição das populações microbianas do trato gastrointestinal torna-se importante quando se visa melhorar a utilização de alimentos por peixes.

O estudo da diversidade microbiana intestinal de carpa capim vem crescendo (Han et al., 2010; Ni et al., 2012; Wu et al., 2012; Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013; Li et al., 2014 e Wang et al.; 2014b). Esse interesse se deve ao fato de que ainda há muito a ser compreendido sobre a associação desses microrganismos com o seu hospedeiro.

Estudos chineses apontam os filos bacterianos que compõem o intestino dessa espécie de peixe, sendo que os filos dominantes encontrados variam de acordo com os métodos experimentais utilizados para essas análises (Tabela 1). Han et al. (2010), ao analisarem sequências gênicas de RNAr 16S da população microbiana intestinal de carpas oriundas de tanques de criação, alimentadas com ração comercial e caniço (*Phragmites australis*), apontam os filos Proteobacteria e Firmicutes como os maiores representantes do trato. Wang et al. (2014b), ao analisarem a microbiota intestinal em diferentes fases do desenvolvimento da carpa (ovos e larvas),

encontraram dominância do filo Proteobacteria seguido pelo filo Bacteroidetes. O mesmo padrão de dominância foi encontrado por Wu et al. (2012), ao investigarem a composição e diversidade da comunidade bacteriana intestinal de carpas adultas alimentadas com azevém. Além dos filios mencionados, os autores encontraram a presença dos filios Actinobacteria e Cyanobacteria. Do mesmo modo, Zhou e tal. (2012), ao analisarem a microbiota de carpa capim proveniente de tanques de produção, encontraram Proteobacteria e Bacteroidetes como os filios dominantes, além de representantes dos filios Actinobacteria, Cyanobacteria, Acidobacteria, Fibrobacteres e Fusobacteria. Uma proporção significativa da diversidade é considerada como de bactérias “não classificadas”, por não apresentarem sequências semelhantes depositadas nos bancos de dados (Han et al., 2010; Wu et al., 2012; Zhou et al., 2013; Li et al., 2014).

Tabela 1: Diversidade de filios bacterianos identificados por métodos moleculares por diferentes autores encontrados no conteúdo intestinal de carpa capim.

Referência	Filo
Han et al. (2010)	Proteobacteria, Firmicutes
Wu et al. (2012)	Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Cyanobacteria
Wang et al. (2014b)	Proteobacteria, Bacteroidetes

O primeiro relato sobre a presença de bactérias anaeróbias obrigatórias na microbiota intestinal de carpa capim, truta arco-íris e dourado foi apresentado por Trust e colaboradores em 1979, por isolamento em câmara anaeróbia. A identificação por métodos bioquímicos revelou a ocorrência dos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Eubacterium*, em ordem de abundância, entre os isolados do conteúdo intestinal de carpa capim. Para truta arco-íris e dourado, os gêneros encontrados em maior abundância foram *Fusobacterium* e *Bacteroides*, respectivamente.

Li et al. (2013), ao analisarem o ganho de peso de alevinos da espécie carpa

comum transgênica, *Cyprinus carpio* L., que possui um corpo mais largo devido a estimulação do gene do hormônio do crescimento gcGH, comparada com a linhagem selvagem, observaram diferenças significativas na composição da microbiota entre os dois grupos analisados. Nesse estudo, os filos bacterianos predominantes foram Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Desses, os que apresentaram maior representatividade foram Bacteroidetes e Firmicutes e a proporção de cada comunidade bacteriana (maior abundância de Firmicutes em relação à Bacteroidetes) foi relacionada como um dos possíveis fatores responsáveis pelo ganho de peso dos animais transgênicos em relação aos selvagens. O superior ganho de massa apresentado por *C. carpio* L. pode ser atribuído à alta eficiência de fermentação de polissacarídeos apresentada pelo filo Firmicutes (Li et al., 2013).

Segundo dados compilados por Nayak (2010), os gêneros bacterianos mais encontrados em peixes, tanto marinhos quanto de água doce, em ordem decrescente, foram *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacteria*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Fusarium* e *Bacteroides*.

Contrariando esses dados, estudos de Wu et al. (2012) sobre a diversidade microbiana intestinal de carpa capim indicam que a microbiota possui maior abundância de bactérias que degradam celulose, incluindo sequências da subunidade ribossomal (RNAr 16S) relacionadas aos gêneros *Anoxybacillus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, *Actinomyces* e *Citrobacter*. Foram encontradas também bactérias com potencial probiótico (*Bifidobacterium*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*) e patogênico (*Aeromonas*), em baixas quantidades. Ni et al. (2012) sugerem que *Cetobacterium* seja o gênero mais representativo do intestino de larvas de carpa capim, alimentadas com forragem em tanques de criação.

Em relação à diversidade de bactérias celulolíticas, sob condições aeróbias de cultivo e relacionadas à degradação do capim sudão e dieta artificial, o gênero bacteriano dominante encontrado foi *Aeromonas*, seguido por *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Bacillus*, *Raoultella*, *Klebsiella*, *Hydrothalea*, *Pseudomonas* e *Brevibacillus*. Uma correlação positiva entre a comunidade celulolítica bacteriana que habita o intestino de carpa capim e o teor de fibra alimentar foi também sugerida (Li et al., 2014).

Ao avaliar o conteúdo intestinal e o conteúdo do ceco de perca zebra (*Hermosilla azurea*) pelo sequenciamento do gene RNAr 16S a partir de colônias

puras isoladas, Fidopiastis et al. (2006) identificaram os gêneros *Enterovibrio*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Desulfovibrio* e sugerem que a diversidade microbiana aumenta da região anterior para a posterior (intestino posterior e ceco). Além disso, o ceco foi o local que apresentou maior número de bactérias em relação às demais regiões avaliadas.

Segundo Ward et al. (2009), o peixe marinho onívoro (*Notothenia coriiceps*) apresenta uma maior diversidade microbiana quando comparado com o peixe marinho carnívoro (*Chaenocephalus aceratus*), sugerindo que a tendência à herbivoria poderia levar a uma maior diversificação da microbiota intestinal, assim como ocorre em mamíferos.

Os dados mencionados acima demonstram que há uma grande diversidade bacteriana presente no trato intestinal de peixes, além de sugerirem que essa população pode ser alterada conforme o ambiente habitado pelo animal, bem como pela dieta ingerida.

2.3.1 Utilização de carboidratos

Os carboidratos são considerados a principal fonte de energia nas dietas de peixes, podendo exercer influência importante sobre o metabolismo desses animais. No entanto, a quantidade de carboidratos adicionados à alimentação deve ser avaliada para que seja convertida em energia de forma eficiente. As pectinas, hemiceluloses e amidos possuem importantes características de peletização, sendo utilizadas pela indústria de ração para peixes (revisado por Hemre et al., 2002).

As diversas espécies de peixes apresentam uma grande diferença em digerir carboidratos devido a variações na anatomia e funcionalidade dos órgãos do trato digestório. Peixes herbívoros e onívoros parecem ter maior capacidade de hidrolisar carboidratos quando comparados com peixes carnívoros (Krogdahl et al., 2005).

Ao avaliar a capacidade de utilização de duas fontes de carboidratos, ração formulada com 30% de glicose ou 30% de amido de milho por carpa capim, Tian et al. (2010) demonstraram que a dieta contendo glicose apresentou um melhor desempenho em relação ao amido, apresentando maior ganho de peso, maior

eficiência alimentar, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica e maior quantidade de lipídeo corporal e triglicerídeos séricos, podendo ser considerada como a fonte alimentar mais adequada para essa espécie de peixe.

Estudos demonstram que a microbiota intestinal é influenciada pelos componentes da dieta (Saha et al., 2006; Han et al., 2010; De et al., 2012; Pedrotti et al., 2013; Li et al., 2014; Ni et al., 2014). A carpa capim, por ser herbívora, consome uma grande quantidade de carboidratos fornecidos pelas plantas aquáticas; no entanto, os carboidratos não são utilizados de forma eficiente por peixes em comparação aos mamíferos, que tem nos carboidratos uma ótima fonte de energia (Zhou et al., 2013). A celulose é o carboidrato mais abundante da natureza, além de ser o elemento principal da parede celular de plantas. Trata-se de um polímero linear de glicose, com ligação β -1,4 de difícil degradação (Wilson e Irwin, 1999). A espécie em questão realiza uma maceração incompleta da matéria vegetal (Hickling, 1966) e retém o alimento no trato intestinal por um período curto (Du et al., 2009), o que poderia justificar uma conversão alimentar mais lenta ao ser alimentada com carboidratos de origem vegetal.

A fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal de diferentes espécies animais produz ácidos graxos de cadeia curta, como o acético, propiônico e butírico, além de gases, CH₄, H₂ e CO₂. Além disso, os microrganismos podem utilizar os carboidratos como esqueleto carbônico para a produção de proteína microbiana, na presença de amônia, bem como para a síntese de vitaminas do complexo B, contribuindo para a nutrição do animal (Bergman, 1990). No entanto, a presença de uma microbiota fermentadora e sua contribuição para o metabolismo de peixes é controversa e precisa ser mais bem explorada (Leenhouwers et al., 2008).

A população microbiana intestinal de carpa capim pode exercer um papel de grande importância na degradação de polissacarídeos não digeríveis pelo hospedeiro, contribuindo para a nutrição do animal (Ni et al., 2014). A degradação de amido pela microbiota intestinal de tilápia (*Oreochromis niloticus*), amido este não digerido anteriormente por enzimas endógenas também é sugerida em trabalho que avalia a fermentação *in vitro* de carboidratos pelo método de cultivo em batelada (*batch*) (Kihara e Sakata, 1997).

A presença de uma microbiota fermentadora anaeróbia ativa da espécie de peixe onívoro carpa comum (*C. carpio*), detritívoro facultativo, moela sável (*Dorosoma*

cepedianum), de peixe piscívoro achigã (*Micropterus salmoides*) e de piscívoro-invertívoro *white crappie* (*Pomoxis annularis*), foi relatada por Smith et al. (1996), ao avaliarem a presença de bactérias anaeróbias intestinais cultivadas em tubos contendo carboidrato solúvel ou celulose sob condições apropriadas para esse fim. O estudo constatou a presença de bactérias anaeróbias em ambos os tratamentos, sendo que *D. cepedianum* e *C. carpio* apresentaram um volume estimado de $2,4 \times 10^9$ bactérias por mililitro de digesta, enquanto *P. annularis* e *M. salmoides* apresentaram cerca de $1,6 \times 10^5$ bactérias por mL de digesta no tratamento de carboidrato solúvel. O tratamento contendo celulose apresentou as seguintes concentrações de bactérias anaeróbias por mililitro de digesta: $2,3 \times 10^5$ em *D. cepedianum* e $1,5 \times 10^5$ em *C. carpio*. Para as espécies *M. salmoides* e *P. annularis* não foi encontrada a presença de bactérias celulolíticas, o que demonstra que a dieta do animal pode influenciar na composição de espécies bacterianas intestinais de peixes.

Leenhouders e colaboradores (2008) compararam a fermentabilidade de diferentes fontes de carboidratos (glicose, amido de trigo, grão de trigo e arabinoxilano), utilizando o método de incubação *in vitro* tipo *batch*, em condições estritamente anaeróbias. O conteúdo intestinal de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) foi inoculado nesse sistema por um período de 168 horas. A produção de gás foi medida por equipamento de pressão automático e os produtos finais da fermentação (ácidos graxos de cadeia curta, amônia e ácido láctico) foram também analisados. A produção total de gás apresentou diferença significativa entre os substratos testados para ambas as espécies, sendo que o trigo foi a dieta que apresentou maior produção de gás para tilápia ($413,2 \text{ mL.g}^{-1}$ de matéria orgânica) e a de glicose para o robalo ($338,6 \text{ mL.g}^{-1}$ de matéria orgânica).

Os produtos finais de fermentação mais produzidos no tratamento com arabinoxilano e trigo, inoculados com conteúdo intestinal de tilápia foram o ácido acético e ácido butírico ($6,8$ e $2,6 \text{ mmol.g}^{-1}$ para arabinoxilano e $6,36$ e $2,26 \text{ mmol.g}^{-1}$ para trigo, respectivamente), já o tratamento de glicose e de amido de trigo apresentaram produção significativa de ácido láctico ($11,06$ e $2,82 \text{ mmol.g}^{-1}$, respectivamente). O resultado dessa pesquisa sugere que a microbiota das duas espécies possui capacidade de fermentar carboidratos e que há uma grande

diferença entre a composição de produtos finais fermentados entre os diferentes carboidratos analisados (Leenhouders et al., 2008).

Os dados acima mostram que a contribuição de bactérias anaeróbias intestinais para a nutrição de peixes sob dietas ricas em carboidratos torna-se, portanto, importante objeto de pesquisa.

2.3.2 Enzimas digestivas de origem endógena e bacteriana

Hickling (1966) em seu estudo sobre os processos de alimentação de carpa capim demonstrou a presença de enzimas digestivas endógenas ao longo do intestino do animal, observando uma maior concentração de amilase e protease na porção média e lipase na porção anterior do intestino. No entanto, a contribuição funcional da microbiota intestinal de peixes, bem como das enzimas digestivas por elas produzidas tem sido sustentada pela literatura na última década (Ray et al., 2012).

German et al. (2010), em estudo sobre os efeitos do tamanho intestinal e fisiologia digestiva de ciprinídeos herbívoros (*Campostoma*) e carnívoros (*Nocomis*), sugerem que existe associação entre a dieta, tamanho do intestino e atividade enzimática nos gêneros avaliados e que, portanto, a observação da anatomia e fisiologia do trato intestinal de peixes pode indicar a especialização a diferentes dietas, quando comparadas entre espécies estreitamente relacionadas.

A atividade da amilase endógena é maior em peixes herbívoros que em peixes carnívoros (German, 2004), o que também ocorre na comparação entre peixes de água doce e peixes marinhos (Day et al., 2011). A atividade da amilase é encontrada em maior concentração na região proximal do intestino de peixes herbívoros, e diminuída ao longo do trato intestinal (Skea et al., 2005), diferente do que ocorre no trato de peixes carnívoros, nos quais a atividade da amilase se mantém constante ao longo do intestino (German, 2009). Uma atividade elevada de amilase foi observada no intestino proximal dos bagres que se alimentam de madeira (*Panaque* sp.cf.*nigrolineatus*, *Panaque nocturnus* e *Hypostomus pyrineusi*) e na espécie de peixe detritívoro *Pterygoplichthys disjunctivus* (German e Bittong, 2009).

Skea et al. (2005), ao compararem a atividade de carboidrases produzidas de forma endógena (parede intestinal) e exógena (fluido intestinal e *pellet* microbiano)

dos peixes herbívoros marinhos *Kyphosus sydneyanus*, *Aplodactylus arctidens* e *Odax pullus*, demonstraram que a maior atividade amilolítica total foi encontrada no fluído intestinal extraído da porção anterior em comparação aos demais e que essa atividade mostrou-se decrescente ao longo do trato intestinal nas três espécies estudadas.

A atividade bacteriana celulolítica no intestino de carpa capim foi observada em diversos trabalhos (Léssel et al., 1986; Saha et al., 2006; Jiang et al., 2011; Zhou et al. 2013). A existência de bactérias celulolíticas e a hipótese da sua contribuição para a utilização da celulose por peixes é sugerida em estudo que avalia a produção de enzimas bacterianas associadas ao intestino das principais carpas indianas (Ray et al., 2010).

Estima-se que cerca de $7,5 \times 10^4$ UFC. g⁻¹ de tecido intestinal de carpa capim seja habitado por bactérias celulolíticas (Saha et al., 2006). No entanto, a simples presença de bactérias que possuem determinada atividade enzimática não necessariamente implica na contribuição delas para a digestão do hospedeiro, mas a existência desses microrganismos em quantidade elevada sugere provável contribuição.

Dados obtidos por plaqueamento em meio de cultura em condições aeróbias demonstram que o gênero bacteriano com maior propriedade celulolítica encontrado tanto em carpa capim quanto em tilápia foi identificado como *Bacillus* (Saha et al., 2006). O potencial do gênero *Bacillus* em produzir celulase também foi observado nos peixes robalo asiático (*Lates calcarifer*) e milkfish (*Chanos chanos*) por De et al. (2012).

A celulase pode ser considerada promotora de crescimento em carpa capim, pois aumenta a atividade de outras enzimas digestivas como amilases e proteases (Zhou et al., 2013). No entanto, esses autores sugerem que a celulase oriunda dos microrganismos possui uma ação limitada no processo de digestão e absorção da fibra bruta, sendo necessária a complementação por via exógena, através da dieta, na forma de aditivo

2.3.3 Ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produtos energéticos gerados a partir da fermentação de fontes alimentares, tendo os carboidratos como seus maiores precursores. Muitas bactérias utilizam a via glicolítica para obtenção de energia a partir de carboidratos, que são, então, convertidos em piruvato e acetil-CoA e a partir dessa etapa, transformados em diferentes produtos de fermentação (Macfarlane e Macfarlane, 2003). Um esquema simplificado das vias metabólicas de degradação de carboidratos em ecossistema ruminal e exemplos de microrganismos envolvidos em cada uma delas é apresentado no anexo 1.

A atividade das enzimas acetil-CoA sintetase e acetil-CoA hidrolase foram mensuradas em diferentes tecidos (fígado, coração, músculo, intestino e rim) de peixes marinhos herbívoros (*Odax cyanomelas* e *Crinodus lophodon*), sendo que a maior atividade da acetil-CoA sintetase foi encontrada no rim de *O. cyanomelas* e *C. lophodon* (3,55 e 6,48 mmol.s⁻¹.gramas de tecido⁻¹, respectivamente). A maior atividade da acetil-CoA hidrolase foi encontrada no fígado de *O. cyanomelas* e *C. lophodon* (91,22 e 57,35 mmol.s⁻¹.gramas de tecido⁻¹, respectivamente). Esses dados sugerem que os AGCC produzidos pelo metabolismo da microbiota intestinal podem ser utilizados como fontes de energia ou para síntese de lipídeos por peixes (Clements, et al., 1994).

Dentre os principais AGCC gerados durante a fermentação pela população microbiana de peixes, inclui-se o ácido acético, seguido por propiônico e butírico (Mountfort et al., 2002; Leenhouders et al., 2008; German, 2009; Rurangwa et al., 2009).

O acetato também foi o ácido graxo encontrado com maior prevalência em todas as regiões intestinais do peixe herbívoro marinho perca zebra (*Hermosilla azurea*). No entanto, a quantidade total de AGCC apresenta-se em ordem crescente, da região anterior à posterior, esta última compreendendo o intestino posterior e o ceco (Fidopiastis et al., 2006). A produção de acetato por microrganismos fermentadores pode representar uma fonte energética importante para peixes (Mountfort et al., 2002).

German (2009), ao analisar a concentração total de AGCC das porções proximal, mediana e distal de espécies herbívoras de peixes (*Campostoma*

anomalum, *C. ornatum*, *C. oligolepis* e *C. pauciradii*) e das porções proximal e distal da espécie carnívora (*Nocomis micropogon*), não encontrou diferença significativa entre as diferentes porções intestinais avaliadas e sugere que a fermentação não se concentra em uma única região do intestino.

Em contraste, Kihara e Sakata (2002), em estudo que avaliou a produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota intestinal de carpa (*C. carpio* L.) em sistema de fermentação *in vitro* (*batch*), sob diferentes fontes de oligossacarídeos (rafinose, lactosacarose, gentiobiose, 4'-galactoselactose, 6'-galactoselactose, soja-oligosacarídeo, xilo-oligosacarídeo e isomalto-oligosacarídeo), concluem que os microrganismos da porção posterior do intestino de carpa podem utilizar oligossacarídeos como substrato em culturas *in vitro* e sugerem que a rafinose e a soja foram as fontes alimentares que apresentaram alta fermentabilidade pela população microbiana, apresentando ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico como principais produtos de fermentação.

2.4 SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO*

Modelos de fermentação intestinal *in vitro* são técnicas que vêm sendo utilizadas por pesquisadores para compreensão dos processos fermentativos realizados pela microbiota intestinal, sua funcionalidade e possível interação com o hospedeiro, além de ser uma alternativa aos testes *in vivo*, avaliados de forma mais rigorosa pelos conselhos de ética (revisado por Payne et al., 2012). Os modelos de fermentação *in vitro* permitem, por exemplo, avaliar a fermentação de proteínas e carboidratos, metabolismo de ácidos biliares, esteroides, ligninas e fitoestrogênio e transformação de substâncias xenobióticas. Esses modelos podem ser compostos por culturas puras ou mistas ou por material fecal e podem ser realizadas de forma simples, em frascos de soro (batelada) ou em sistemas contínuos e sofisticados, com controle de pH e simulação de condições ambientais ocorridas naturalmente nas diferentes porções intestinais (Macfarlane e Macfarlane, 2007). Nesses sistemas de fermentação *in vitro*, utiliza-se também conteúdo intestinal como fonte de bactérias fermentadoras (Leenhouders et al., 2008).

Assim como todas as demais técnicas laboratoriais, a fermentação *in vitro* também possui suas vantagens e limitações e essas características foram demonstradas por Macfarlane e Macfarlane (2007). Esses métodos apresentam fatores vantajosos como custo, facilidade para operar e estabelecer o sistema de fermentação, permitindo o estudo de mecanismos de degradação, facilitando a utilização de substâncias tóxicas, genotóxicas ou radioativas, e em sistemas de fermentação contínuos há a possibilidade de maior manipulação de variáveis ambientais, além de não haver restrição ética para esse tipo de estudo.

Como desvantagens, os autores apontam o fato de que há dificuldade em controlar a estrutura e mudanças na comunidade microbiana, principalmente em sistemas fechados, não permitindo a atuação do sistema imune ou endócrino do hospedeiro. Fatores bióticos como secreções do trato digestivo e processos de absorção não são adicionados ao sistema, além de não reproduzir a colonização do epitélio e de biofilmes.

Conforme revisado por Payne et al. (2012), a fermentação em batelada (*batch*) é um sistema de fermentação fechado, geralmente reproduzido em garrafas, em condições anóxicas, contendo suspensão bacteriana pura ou mista e meio de cultura e nutrientes selecionados, sem que haja a adição desses compostos após o início do processo fermentativo. Essas fermentações são utilizadas para avaliação de metabólitos como AGCC e para a investigação de componentes da dieta como carboidratos complexos, amidos resistentes e frutanos e seu possível potencial probiótico. No entanto, o tempo de fermentação nesse sistema é curto, pois o crescimento microbiano é dependente da densidade de inoculação inicial e do esgotamento de nutrientes, que, em conjunto com a produção de compostos tóxicos, interrompe o crescimento populacional microbiano. Além disso, a formação de AGCC pela microbiota provoca alterações de pH e do potencial redox e o processo fermentativo ocorre na ausência de um controle de pH.

Russell (1998) observou que a queda do pH, com valores abaixo de 5,7 inibiu a fermentação de feno em sistema de fermentação *in vitro*, além de diminuir a produção de metano e a relação acetato:propionato ao avaliar o efeito do pH sobre a fermentação ruminal. O autor também sugere que bactérias fermentadoras de amido se adaptam a baixos valores de pH. As bactérias celulolíticas são sensíveis a mudanças de pH, sendo afetadas com o declínio desse parâmetro, que ocasiona

prejuízos na produção celular desse grupo bacteriano, quando analisadas em sistema contínuo (Russell e Dombrowski, 1980).

O baixo pH em sistemas contínuos também pode diminuir a concentração de amônia presente no meio de cultivo, afetando o crescimento de bactérias que necessitam dessa fonte de nitrogênio em seu metabolismo. A diminuição na concentração de NH_3 em pH abaixo de 6 pode ser ocasionada pela diminuição na atividade da protease, associada à falta de deaminase, em razão de uma menor quantidade de bactérias proteolíticas encontradas em pH ácido (Erfle et al., 1982).

Erfle et al. (1982) observaram a diminuição da produção total de ácidos graxos em pH ácido (5,0) em sistema de fermentação contínuo contendo silagem de milho e microrganismos ruminais. No entanto, em sistema fermentativo fechado, a produção de ácidos graxos produzido por bactérias ruminais que receberam 90% de grão de milho quebrado foi aumentada em pH 5,2 em comparação ao produto de fermentação observado em pH 6,5 (Russell, 1998).

Experimentos que utilizam bactérias ruminais em sistemas de incubação *in vitro* fazem uso de altas concentrações de bicarbonato (Terry et al., 1969), que possui função de tamponamento do meio de fermentação, também chamado de saliva artificial (Erfle et al., 1982).

Diversos trabalhos têm utilizado sistemas de fermentação *in vitro* em batelada para a compreensão dos processos fermentativos em humanos (Coles et al., 2005; Hughes et al., 2007; Macfarlane e Macfarlane, 2007; Payne et al., 2012), leitões (Williams et al., 2005) e peixes (Kihara e Sakata, 1997; Kihara e Sakata, 2001; Kihara e Sakata, 2002; Leenhouders et al., 2008), mostrando a utilidade desses sistemas para a compreensão dos processos de degradação de alimentos por microrganismos, assim como para o entendimento da simbiose entre a microbiota e o hospedeiro.

2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS

Apenas uma pequena parcela das populações microbianas do ambiente pode ser cultivada em laboratório (Nichols et al., 2008) e acredita-se que 99% a 99,9% das bactérias existentes sejam incultiváveis (Pace et al., 1995).

Estudos sobre a composição microbiana presente no trato intestinal de peixes utilizando métodos convencionais de identificação (morfológicos e bioquímicos) a partir de amostras homogeneizadas de conteúdo intestinal e fecal cultivadas em meios de cultura seletivos ou não, demonstraram-se não confiáveis, pois tratam-se de métodos com pouca precisão e sensibilidade, além de serem demorados e trabalhosos. Além disso, esse tipo de análise pode selecionar alguns organismos em detrimento de outros (Nayak, 2010).

Técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas para caracterizar a microbiota de peixes, seja em conjunto ou separadamente de técnicas convencionais (Huber et al., 2004; Fidopiastis et al., 2006; Liu et al., 2008; Mondal et al., 2010; Ray et al., 2010; Jiang et al., 2011; McDonald et al., 2012, Li et al., 2014).

Como exemplo, sequências da subunidade menor (16S) de ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) são rotineiramente utilizadas para a identificação e taxonomia de microrganismos, revolucionando os estudos nessa área. Os resultados obtidos com o RNAr 16S são vantajosos, sendo independentes de fatores externos, como condições de crescimento e meio de cultura utilizados. Mutações no gene de RNAr 16S se acumularam lentamente, mas de forma constante, durante a evolução (Woese, 1987), e essas mutações estão, na maioria das vezes localizadas em regiões divergentes bem definidas, chamadas de regiões variáveis e hipervariáveis.

Esse padrão de conservação/variabilidade das sequências é utilizado para se determinar a identidade de um microrganismo de uma amostra qualquer e pode também levar à identificação de microrganismos nunca antes identificados. O gene RNAr 16S possui aproximadamente 1540 nucleotídeos e gera informações para deduções filogenéticas (Young, 1992).

Além disso, de acordo com Olsen (1986) e Woese (1987), as principais características que tornam a sequência do RNAr um excelente marcador filogenético são: a) moléculas universais, ocorrendo em todos os organismos, sendo que diferentes posições em sua sequência evoluem em diferentes taxas, permitindo medir relações filogenéticas em quase todos os níveis, entre organismos próximos e distantes; b) são elementos chave da maquinaria da síntese de proteínas e são funcional e evolutivamente homólogos em todos os organismos; c) são moléculas extremamente conservadas em toda a sua estrutura; d) as sequências de nucleotídeos também são conservadas. As sequências e os elementos de estrutura

secundária conservada permitem o alinhamento de sequências variáveis, permitindo que somente nucleotídeos homólogos sejam empregados em análises filogenéticas; e) fornecem informação de sequência suficiente para permitir comparações estatísticas significativas; f) aparentemente os genes de RNA ribossomais não sofrem interferência de transferências laterais ou horizontais.

O sequenciamento das regiões do gene de RNAr 16S e sua comparação com sequências disponíveis em bancos de dados de sequências conhecidas de 16S possibilita que a identificação de um microrganismo possa ser feita de forma rápida e precisa. O avanço tecnológico que contempla a evolução de novos sequenciadores automáticos e de novos softwares vem permitindo a análise de dados (sequências de RNAr 16S) em grande escala. Essa capacidade de análise pode permitir a exploração das comunidades microbianas, como por exemplo, características ecológicas dos táxons, possibilitando estudos sobre a influência das mudanças ambientais na estrutura das comunidades microbianas e, ainda, auxiliar na identificação de novos filós bacterianos incultiváveis (Caporaso et al., 2011).

Outra facilidade em se trabalhar com sequências de RNAr 16S é o fato delas estarem disponíveis em bancos de dados, a maioria gratuitos, como por exemplo RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>) e Gen-Bank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Além da análise comparativa das sequências obtidas em laboratório com as depositadas no banco de dados, o usuário ainda possui a opção de depositar sequências novas, o que faz com que a base de dados se mantenha em contínua expansão.

O uso de ferramentas moleculares para identificação de microrganismos ambientais torna-se, portanto, de extrema importância, por se tratar de técnicas rápidas e precisas, dando confiabilidade ao processo de caracterização microbiológica de ambientes diversos, em condições aeróbias ou anaeróbias, possibilitando, ainda a descoberta de organismos desconhecidos.

Em resumo, a revisão apresentada neste capítulo ressalta a importância da expansão dos estudos sobre a microbiota intestinal de peixes. O acúmulo de informações nessa área permitirá um maior entendimento sobre a interação entre o animal e seus microrganismos, além da compreensão a respeito do papel funcional da população microbiana na degradação do alimento e conversão de energia em ganho de peso animal.

CAPÍTULO 3

FERMENTABILIDADE DE CARBOIDRATOS PELA MICROBIOTA INTESTINAL DE CARPA CAPIM (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*) EM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO* (BATCH).

RESUMO

A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) consome um volume elevado de matéria vegetal e tem sido utilizada para controle de plantas aquáticas. Parte da celulose contida nestes vegetais acredita-se ser degradada por bactérias intestinais. Fontes alimentares constituídas de carboidratos, ao serem metabolizadas em ambiente anaeróbio, geram produtos secundários como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que fornecem energia e carbono necessários para a manutenção do metabolismo do animal. A identificação das bactérias que habitam o trato intestinal desses animais é fundamental para a compreensão do processo fermentativo, e para isso o uso de ferramentas de biologia molecular, como a utilização de sequências do RNAr 16S, é indicado. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade fermentativa *in vitro* de diferentes fontes de carboidrato pela microbiota intestinal do peixe carpa capim e realizar a caracterização molecular das bactérias presentes após a fermentação *in vitro*. Nove espécimes de carpa capim foram coletados de viveiros escavados do setor de piscicultura da PUCPR (LAPEP). Os animais foram eutanasiados e seus intestinos foram retirados. O conteúdo intestinal foi incubado em meio de cultivo anaeróbio contendo feno de alfafa, fubá de milho e glicose como fontes de carbono. Os valores de pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram medidos em 0h, 8h, 12h, 24h e 48h, sob diferentes temperaturas de incubação (18 °C, 26 °C e 37 °C). As análises de AGCC foram realizadas para os tempos 0h, 8h e 48h, a partir de amostras incubadas a 26 °C. Após 48h de incubação, foi extraído o DNA do conteúdo dos frascos de fermentação, seguido por amplificação por PCR do gene RNAr 16S utilizando os primers 27F e 1492R. O produto de PCR foi clonado e o DNA plasmidial dos clones foi extraído por miniprep e seus fragmentos foram sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas presentes nos bancos de dados RDP e GenBank. O meio apresentou acidificação de 6,8 para 6,6 no tratamento com glicose; de 6,9 para 5,9 com fubá e manteve-se inalterado no tratamento de feno (6,9). A concentração de N-NH₃ observada nos tempos 0h e 48h variou de 2,2 mM a 3,3mM; de 2,4 mM a 2,8mM e de 2,4 mM a 3,9mM nos tratamentos contendo glicose, fubá e feno, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as concentrações de N-NH₃ e as diferentes temperaturas de incubação. A concentração total de AGCC mensurada nos tempos 0h e 48h de incubação na temperatura de 26 °C foi de 8, mM a 28 mM para glicose, 3,7 mM a 63,4 mM para fubá e de 4,6 mM a 18,6 mM para feno. Os filos mais abundantes identificados nos tratamentos de glicose e feno incubados a 26 °C foram, em ordem decrescente, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria. Entre os gêneros bacterianos identificados, os mais abundantes foram *Eubacterium*, *Pseudomonas* e *Clostridium* na amostra contendo

glicose e *Cetobacterium*, *Clostridium* e *Anaerosinus* na amostra contendo feno. As espécies bacterianas identificadas foram *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium* sp., *Clostridium butyricum* e *Pseudomonas* sp. no tratamento com glicose e *Clostridium* sp., *Robinsoniella peorienses*, *Cetobacterium somerae* e *Hafnia alvei* no tratamento de feno. Os resultados encontrados demonstram que a microbiota intestinal de carpa capim possui capacidade significativa de fermentar carboidratos, considerando os dados de pH, AGCC e produção de gás, quando comparados com valores obtidos para outros peixes. A caracterização molecular predominante de microrganismos anaeróbios demonstra que condições de anaerobiose foram mantidas durante o experimento. A diversidade microbiana encontrada, bem como os parâmetros de fermentação sugerem que a dieta exerceu influência sobre a microbiota intestinal e consequentemente sobre o potencial fermentativo do conteúdo do intestino de carpa capim.

Palavras-chave: Carpa capim. Carboidrato. Fermentação *in vitro*. RNAr 16S.

ABSTRACT

The grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) ingests large amounts of plant material and has been used to control aquatic plants. Part of the cellulose present in the plants is believed to be degraded by intestinal bacteria. Dietary sources comprised of carbohydrates when metabolized in an anaerobic environment generate short chain fatty acids (SCFA) which provide energy and carbon necessary for the maintenance of the animal's metabolism. The identification of bacteria that inhabit the intestinal tract of animals is fundamental to the understanding of the fermentation process and the use of molecular biology tools such as the 16S rRNA sequences is recommended. This work aimed to evaluate the in vitro fermentative ability of the intestinal microbiota of the grass carp on different sources of carbohydrates and to characterize the bacteria present following in vitro fermentation. Nine grass carp specimens were collected from excavated ponds located in the fish farm of PUCPR (LAPEP). Animals were euthanized and their intestines were removed. The intestinal contents were incubated in anaerobic culture medium containing either alfalfa hay, corn meal and glucose as carbon sources. The pH and ammonia (NH₃) values were measured at 0h, 8h, 12h, 24h and 48h under different incubation temperatures (18°C, 26°C and 37°C). The analysis of SCFA were performed on samples from incubation times of 0h, 8h and 48h and at 26°C. After 48 h of incubation, DNA was extracted from the contents of the fermentation flasks, followed by PCR amplification of the 16S rRNA gene using primers 27F and 1492R. The PCR product was cloned, the plasmid DNA was extracted by miniprep and fragments were sequenced. Sequences were compared to those present in GenBank and RDP databases. Upon incubation, media suffered acidification, with pH values reducing from 6.8 to 6.6 in the glucose treatment; from 6.9 to 5.9 in the cornmeal treatment and remained unchanged in the hay treatment (6,9). The concentration of NH₃ at 0h and 48h ranged from 2.2 mM to 3.3 mM; 2.4 mM to 2.4 mM; and 2.8mM to 3.9mM in glucose, corn and hay treatments, respectively. There was no significant difference between the N-NH₃ concentrations in the different incubation temperatures. The concentration values of total SCFA measured at 0h and 48h at 26 ° C was 8 mM and 28 mM under glucose, 3.7 mM and 63.4 mM under cornmeal, and 4.6 mM and 18, 6 mM under alfalafa hay. The most abundant phyla identified in glucose and hay treatments incubated at 26°C were, in descending order, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes and Fusobacterium. Among the identified bacterial genera, the most abundant were *Eubacterium*, *Pseudomonas* and *Clostridium* in the glucose treatment, and *Cetobacterium*, *Clostridium* and *Anaerosinus* in hay. Identified bacterial species were *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium* sp., *Clostridium butyricum* and *Pseudomonas* sp. in the treatment with glucose, and *Clostridium* sp., *Robinsoniella peorienses*, *Cetobacterium somerae* and *Hafnia alvei* in the treatment with hay. The results show that the intestinal microbiota of grass carp has significant capacity to ferment carbohydrates, when pH, SCFA and gas production data were compared to values obtained for other fish. The molecular characterization of predominantly anaerobic microorganisms shows that anaerobic conditions were maintained during the experiment. The microbial diversity observed under the various treatments as well as the values of the fermentation parameters suggest that the diet influence the intestinal microbiota and hence the fermentation potential of the grass carp gut contents.

Keywords: Grass Carp, Carbohydrate, *in vitro* Fermentation, 16S rRNA.

3.1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos são considerados a principal fonte de energia nas dietas de peixes, e podem exercer influência importante sobre o metabolismo desses animais (revisado por Hemre et al., 2002). No entanto, a capacidade em digerir carboidratos difere entre as diversas espécies de peixes, devido a variações na anatomia e funcionalidade dos órgãos do trato digestivo (Krogdahl et al., 2005).

O estudo de Cahill (1990) sugere que a microbiota intestinal de carpa capim pode ser influenciada pelo ambiente externo; no entanto, outros autores indicam que essa influência pode ser atribuída aos componentes da dieta (Saha et al., 2006; Han et al., 2010; De et al., 2012; Pedrotti et al., 2013; Li et al., 2014 e Ni et al., 2014). Dentre os grupos bacterianos estudados no trato desse animal, destacam-se os filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Han et al., 2010; Wang et al., 2014).

A população microbiana intestinal de carpa capim participa da degradação de polissacarídeos não digeríveis pelo hospedeiro, além de ajudar o animal a alcançar a homeostase fisiológica e nutricional (Ni et al., 2014). O processo de fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal produz subprodutos energéticos que são utilizados na nutrição do hospedeiro, incluindo ácidos graxos, bem como gases, proteínas e vitaminas do complexo B (Bergman, 1990).

Técnicas de fermentação *in vitro* são utilizadas para compreensão dos processos fermentativos realizados pela microbiota intestinal (Payne et al., 2012). Esses modelos permitem, por exemplo, avaliar a fermentação de proteínas e carboidratos, metabolismo de ácidos biliares, esteroides, ligninas e fitoestrogênio e a biotransformação de xenobióticos. São compostos por culturas puras ou mistas ou por material fecal e podem ser realizadas de forma simples, em frascos de soro (batelada) ou em sistemas contínuos e sofisticados, com controle de pH e simulação de condições ambientais (Macfarlane e Macfarlane, 2007).

Para um maior entendimento da composição microbiana do trato intestinal de peixes, bem como das bactérias envolvidas nos processos fermentativos, faz-se necessária a identificação desses microrganismos. Para isso, técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas, seja em conjunto ou separadamente de técnicas convencionais (Huber et al., 2004; Fidopiastis et al., 2006; Liu et al., 2008; Mondal et al., 2010; Ray et al., 2010; Jiang et al., 2011; McDonald et al., 2012, Li et al., 2014).

O sequenciamento das regiões do gene de RNAr 16S e sua comparação com sequências obtidas em bancos de dados de sequências conhecidas de 16S possibilita que a identificação de um microrganismo possa ser obtida de forma rápida e precisa. A exploração das comunidades microbianas permite identificar características ecológicas dos táxons, auxilia na identificação de filos bacterianos não cultiváveis além de permitir uma melhor compreensão sobre a relação das comunidades microbianas com a saúde e a doença (Caporaso et al., 2011).

A partir da hipótese de que bactérias que habitam o trato gastrointestinal de carpa capim têm a capacidade de fermentar carboidratos da dieta, o objetivo desse estudo foi avaliar a fermentabilidade de glicose, amido de milho (fubá) e feno de alfafa; que caracterizam-se como de degradabilidade rápida e completa, relativamente rápida e praticamente completa e degradabilidade lenta e incompleta, respectivamente, pela microbiota intestinal de carpa capim. A caracterização molecular dessa população através de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S, a partir de amostras fermentadas em sistema de fermentação *in vitro* em batelada (*batch*), em condições anaeróbias também foi objetivada.

Espera-se que pela obtenção de dados do potencial de fermentação dessas bactérias se possam desenvolver técnicas de manipulação da dieta de forma a permitir o uso de fontes alimentares ricas em carboidratos estruturais com maior eficiência e conseqüente redução de custos de alimentação. O entendimento do metabolismo desses microrganismos anaeróbios também poderá impactar no surgimento de produtos biotecnológicos no futuro, como por exemplo, a produção de novos probióticos.

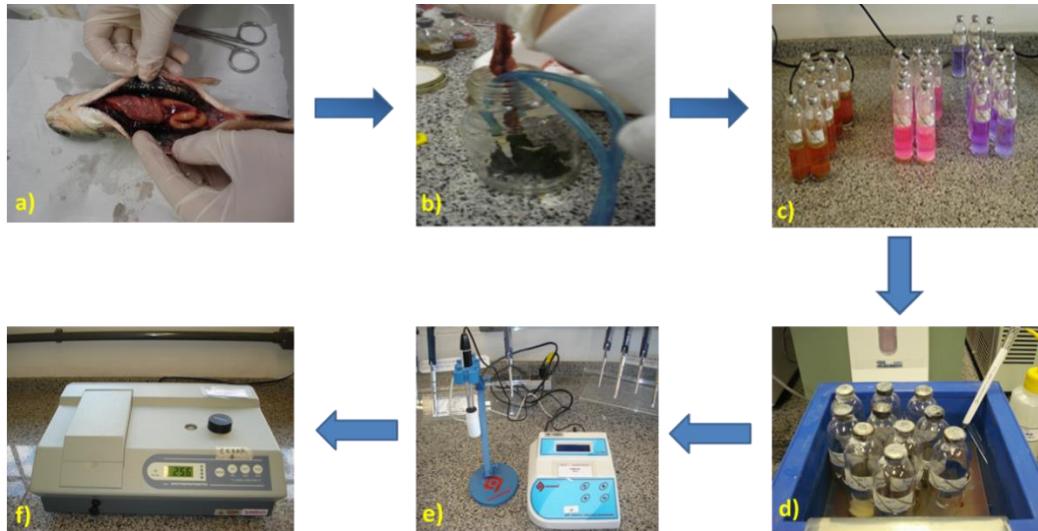
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Descrição resumida dos experimentos realizados

Foram realizadas duas coletas de carpas capim para obtenção de conteúdo intestinal a ser incubado com dietas contendo diferentes fontes de carboidratos, em outubro de 2013 e em fevereiro de 2014, sendo capturados quatro (4) e cinco (5) animais, respectivamente. Os peixes foram eutanasiados e seus intestinos foram retirados, medidos e pesados. O conteúdo intestinal foi coletado manualmente por fricção e acondicionado sob atmosfera de CO₂. Uma alíquota do conteúdo intestinal foi incubada em frascos contendo as dietas em estudo em duplicata, embebidas em uma solução tamponada e saturada com CO₂. Os frascos foram vedados e lacrados e finalmente incubados em banho-maria sob diferentes temperaturas por 48 h.

Alíquotas das amostras fermentadas foram retiradas dos frascos com auxílio de seringa e agulha para análise de pH, N-NH₃ (nitrogênio amoniacal) e AGCC (ácidos graxos de cadeia curta) nos tempos 0h, 4h, 8h, 12h, 24h e 48 h (Fig. 1). Após 48h de incubação, as duplicatas do conteúdo do frasco de cada dieta testada foram homogeneizadas e congeladas para posterior extração de DNA e análises moleculares.

Figura 1: Esquema representativo do estabelecimento da fermentação anaeróbia *in vitro*. a) incisão ventral; b) coleta do conteúdo intestinal sob CO₂; c) frascos contendo dietas de carboidrato + solução basal; d) frascos contendo conteúdo intestinal + dieta + solução basal, incubados em banho maria; e) potenciômetro utilizado para análise de pH; f) espectrofotômetro utilizado para análise de N-NH₃.



3.2.2 Coleta dos animais

Espécimes de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) foram coletados de viveiros escavados da unidade de piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP-PUCPR), com o auxílio de redes de arrasto (Fig. 2). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial, além de terem acesso a macrófitas aquáticas e plantas das margens dos tanques. O pH, a temperatura da água do tanque, a temperatura ambiental, bem como o oxigênio dissolvido na água foram mensurados (anexo 2). Os animais foram eutanasiados imediatamente após sua captura, por meio de imersão em superdosagem (13%) de benzocaína (etilaminobenzoato). Em seguida, os peixes foram submetidos à biometria determinando-se o peso (P), comprimento padrão (CP) e comprimento total (CT) de cada animal (Fig. 3).

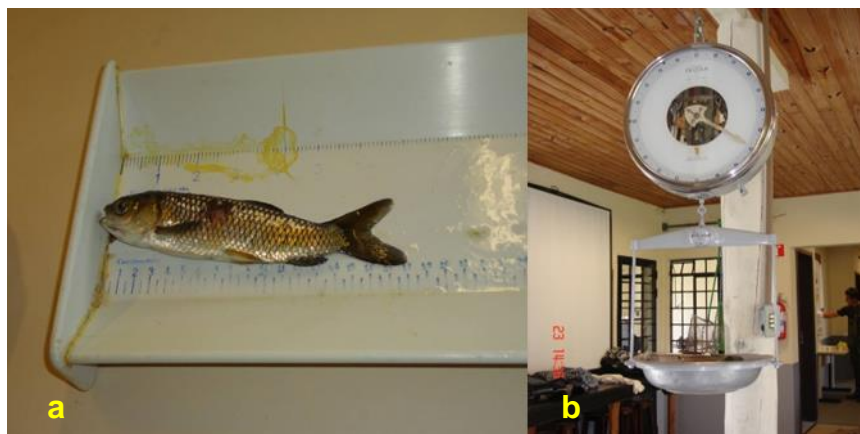
Os peixes coletados para obtenção de conteúdo intestinal pesaram entre 450 g e 3,16 kg, com CT variando entre 35,5 cm e 69 cm (coleta out/2013) e de 1,3 Kg a 5 Kg, com CT entre 50 cm a 75 cm (coleta fev/2014) (Anexo 3). Um “pool” do conteúdo

intestinal de todos os animais foi utilizado para os ensaios de fermentação em cada coleta. Logo após a avaliação biométrica, os animais foram acondicionados em caixas térmicas contendo gelo e levados ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária da PUCPR, localizado no Câmpus São José dos Pinhais, onde as amostras foram processadas e as análises laboratoriais realizadas.

Figura 2: Coleta dos animais com auxílio de rede de arrasto no setor de piscicultura da PUCPR (LAPEP).



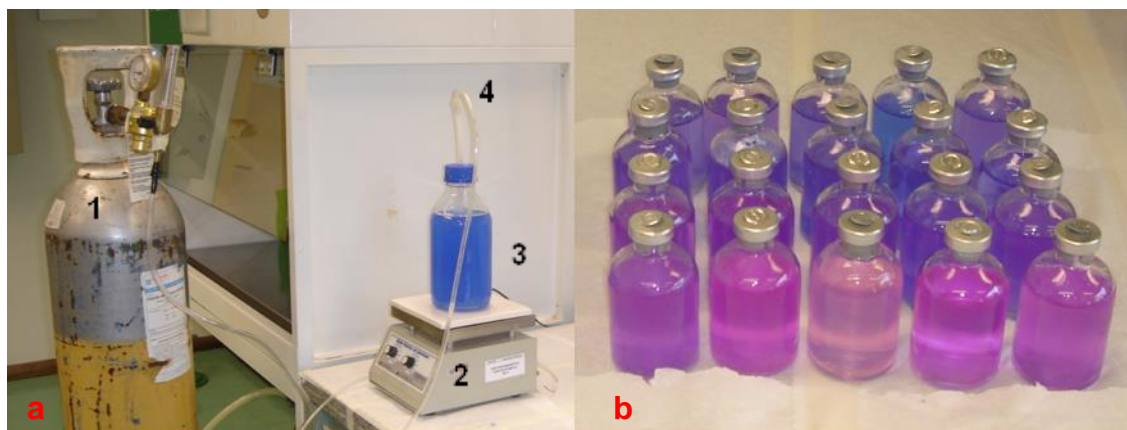
Figura 3: Biometria dos animais após eutanásia com benzocaína. a) verificação do peso do animal; b) verificação do CP e CT com uso de ictiômetro.



3.2.3 Preparo do meio de cultivo anaeróbio

O meio de cultivo anaeróbio foi constituído de uma solução basal (pH 7,0) com composição baseada em McDougall (1948), com adição de microminerais e resazurina como indicador de anaerobiose, segundo Blanchart et al. (1989) com algumas modificações (Tabela 2). A solução basal foi preparada em água deionizada fervida, resfriada sob CO₂ e envasada em frascos de vidro tipo penicilina de 50 mL (Fig. 4). Os frascos foram vedados com rolha de borracha e lacre de alumínio e em seguida autoclavados a 120 °C por 20 min.

Figura 4: Preparo da solução basal. a) frasco contendo meio sob adição de CO₂ sobre placa aquecida, b) frascos tipo penicilina de 50 mL contendo meio saturado com CO₂ e vedados com rolha de borracha e lacre de alumínio.



Destaques na imagem (a): cilindro de CO₂ (1); placa aquecida (2); frasco contendo meio sob injeção de CO₂ (3); mangueira de silicone para adição do CO₂ (4).

Tabela 2: Componentes químicos da solução basal.

Macronutrientes	g.L ⁻¹
KCl	6
NaCl	6
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	14,6
Na ₂ HPO ₄	142
Na ₂ CO ₃	82
CaCl ₂	8
Micronutrientes	g.L ⁻¹
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,02
ZnCl ₂	0,025
CuCl . 2H ₂ O	0,025
COCl ₂ . 6H ₂ O	0,05
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	0,25

3.2.4 Preparo das fontes de carbono

As fontes de carbono utilizadas neste estudo foram glicose, amido de milho comercial (fubá) e feno de alfafa. O fubá e o feno foram pesados (0,7g), armazenados em frascos de vidro tipo penicilina e autoclavados. Aos frascos contendo a dieta foram acrescentados 50 mL de solução basal previamente preparada, sob CO₂. Para a dieta de glicose, adicionou-se 1,4 mL de solução de glicose 20%. Para todas as dietas

foram acrescentados 0,14 mL de solução de NH_4Cl 1M e 0,7 mL de agente redutor de oxigênio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 80mM + cisteína-HCl 160mM) com auxílio de seringa e agulha, e os frascos foram incubados em banho maria a 37 °C até que a solução basal se tornasse incolor, demonstrando, assim, a redução do meio (Fig. 4).

Figura 5: Preparo das fontes de carbono. a) frascos contendo solução basal e frascos contendo as dietas autoclavadas; b) frascos contendo solução basal e dieta saturadas com CO_2 ; c) adição de NH_4Cl e agente redutor com auxílio de seringa e agulha aos frascos contendo dieta e solução basal; d) incubação em banho maria a 37 °C para redução do O_2 .



Destaques na imagem (a) frasco contendo solução basal estéril e saturada com CO_2 (1); frasco contendo dieta autoclavada (2).

3.2.5 Retirada, processamento do conteúdo intestinal em anóxia e inoculação dos frascos de fermentação.

O ventre dos animais foi desinfectado com o uso de gaze estéril embebida em álcool 70% e, posteriormente, aberto com o auxílio de material cirúrgico estéril. O intestino foi retirado e suas extremidades foram amarradas. O tubo intestinal foi medido, usando-se uma régua (Anexo 3). O conteúdo intestinal foi removido, armazenado em béquer estéril com adição de CO₂ e pesado em balança analítica. O preparo do inóculo foi realizado com conteúdo intestinal filtrado em gaze estéril e homogeneizado à solução basal estéril, previamente preparada, sob CO₂, por um período máximo de 5 minutos. Os inóculos foram incubados na proporção de 1:21 ou 1:10 (conteúdo solução basal), nas repetições de out/13 e fev/14, respectivamente, como resultado da quantidade de conteúdo intestinal disponível (Fig. 6). Vinte mililitros do inóculo foram adicionados aos frascos contendo dieta e solução basal. Os frascos contendo os tratamentos (solução basal+dieta+inóculo) foram incubados em banho maria, sem agitação, em duplicata, nas temperaturas de 18 °C, 26 °C e 37 °C por 48h.

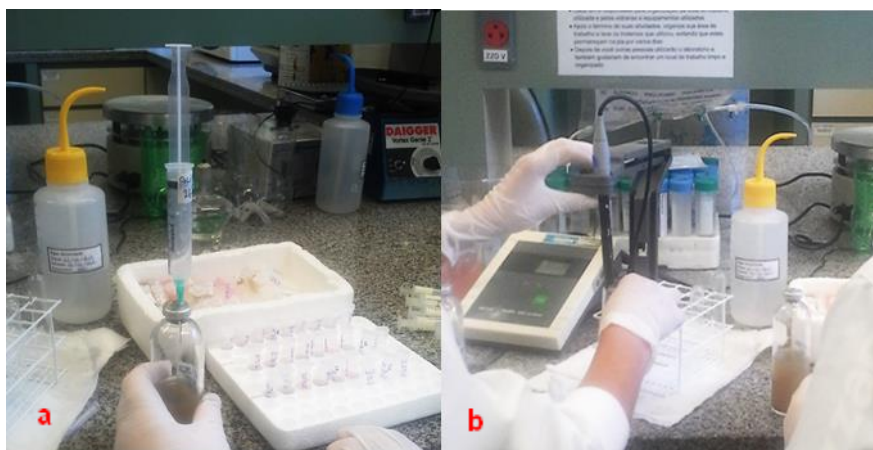
Figura 6: Retirada e processamento do conteúdo intestinal. a) corte ventral com auxílio de material cirúrgico estéril, b) trato intestinal, c) comprimento do intestino x comprimento do animal e d) inóculo saturado com CO₂.



3.2.6 Coleta do conteúdo fermentado

Alíquotas de 5 mL do produto fermentado foram retiradas dos frascos para análise de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com auxílio de seringa e agulha estéreis (Fig. 7). Os tempos de incubação analisados foram 0h, 4h, 8h, 12h, 24h e 48h.

Figura 7: Extração de alíquotas do material fermentado. a) uso de seringa e agulha para coleta do fermentado, b) análise de pH.



Para as análises de N-NH₃ foram utilizados 250 µL de amostra, transferidos para tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf de 2,5 mL, contendo 125 µL de tungstato de sódio 10%, sendo em seguida adicionados 125 µL de ácido sulfúrico 1N gelado. As amostras foram armazenadas a 5 °C e analisadas em até 24h após a coleta (Chaney e Marbach (1962), modificado por Weatherburn (1967)).

Para as análises de AGCC foram utilizados 2 mL de amostra, armazenadas em tubo tipo Eppendorf gelado e centrifugadas a 10000 x g rpm por 20 minutos, a 4 °C. Após, transferiu-se 800 µL do sobrenadante para outro microtubo contendo 200 µL de ácido fórmico. As amostras foram homogeneizadas e estocadas em freezer a -20 °C até o momento da análise (Erwin et al., 1961).

O volume restante de amostra foi utilizado para análise de pH.

3.2.7 Métodos analíticos

3.2.7.1 Análises bromatológicas

As análises bromatológicas das fontes alimentares foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Foram realizadas análises bromatológicas das amostras de fubá e feno e analisou-se: matéria seca (MS), cinza (CZ), proteína bruta (PB), conforme A.O.A.C (1965). As determinações de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas de acordo com Goering e Van Soest (1970).

3.2.7.2 Determinação de pH

O pH da solução basal, do conteúdo intestinal e do conteúdo fermentado foi determinado em potenciômetro digital da marca Toledo, modelo AB 204.

3.2.7.3 Determinação do N-NH₃

Para determinação dos níveis de nitrogênio amoniacal nas amostras, foi utilizado o método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962), modificado segundo Weatherburn (1967). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 630nm. Para a obtenção da curva padrão foi utilizada solução de sulfato de amônio. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em concentração (mg/100mL).

3.2.7.4 Determinação de AGCC

As análises de AGCC foram realizadas pelo Laboratório de Fermentabilidade Ruminal (LFR) da Universidade de São Paulo (USP – FZEA, Pirassununga – SP).

As concentrações de AGCC, tanto do conteúdo intestinal quanto dos fermentados foram medidas por cromatografia gasosa, utilizando-se o cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Japão), através de uma coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA) de 30 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno, a 145 °C (isotérmica) e um injetor split/splitless. Foi utilizado detector de chama (dual FID a 250 °C), conforme método descrito por Erwin et al. (1961), adaptado por Getachew et al. (2002).

Foi utilizado gás hélio como gás de arraste, na vazão de 8,01 mL/minuto, ar sintético como comburente na pressão de 40 KPa e hidrogênio como combustível na pressão de 60 KPa.

O padrão externo foi preparado com ácidos acético (C₂), propiônico (C₃) e butírico (C₄), e isoácidos, isobutírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA) e o padrão interno foi preparado com ácido 2-etil-butírico (Chemservice, USA). Foram realizadas injeções de um microlitro de amostra para cada determinação além de um microlitro do padrão misto (externo + interno). Os cálculos das concentrações de AGCC foram realizados pelo software GCSolution® (Shimadzu, Japão).

Foram realizadas análises de AGCC dos fermentados de glicose, fubá e feno nos tempos de leitura 0h, 8h e 48h, incubadas na temperatura de 26 °C e as concentrações de cada AGCC foram expressas em mM/dl.

3.2.8 Análises moleculares

3.2.8.1 Extração de DNA

O precipitado bacteriano para extração de DNA foi obtido por centrifugação diferencial conforme Zhu et al. (2002). As amostras do conteúdo fermentado das

diferentes fontes de carbono foram coletadas após 48 h de incubação e lavadas com tampão fosfatado (PBS). As amostras passaram por um procedimento de remoção de impurezas segundo. O produto fermentado foi centrifugado a 300 x g por 3 min, o sobrenadante foi coletado e a amostra foi centrifugada novamente a 10000 x g por 3 min. O *pellet* foi ressuspenso com PBS e lavado novamente com PBS e centrifugado na mesma velocidade do procedimento anterior. O precipitado bacteriano foi armazenado a -20 °C até a extração do DNA.

O método de extração de DNA seguiu o procedimento de Zhu et al. (2002), utilizando lisozima e proteinase K, com rompimento físico por *beadbeater* (Biospec) seguido de extração por fenol/clorofórmio. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até o momento da sua utilização no procedimento de amplificação do gene RNAr 16S.

3.2.8.2 Amplificação do gene RNAr 16S

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000c. Foram utilizados 4 ng do DNA de cada amostra no processo de amplificação.

O gene RNAr 16S foi amplificado pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), conforme descrito por Patel et al. (2011), gerando um amplicon de aproximadamente 1465 pares de base (pb).

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research, modelo PTC-200. Após uma desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min foram realizados 30 ciclos de amplificação, cada um consistindo de desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridação a 50 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min. Após 30 ciclos seguiu-se uma extensão final de 10 min a 72 °C. O volume final de cada reação foi de 25 µL (Tabela 3).

Tabela 3: Componentes da reação de PCR para amplificação do gene RNAr 16S e suas respectivas concentrações.

Componentes	Volume na reação (µL)	Concentração das Soluções Estoque	Concentração final
Tampão PCR	2,5	10X	1x
MgCl ₂	1	50 mM	2 mM
dNTP	4	1,25 mM	0,2 mM
Iniciador direto	1,25	10 pmol	0,5 pmol
Iniciador reverso	1,25	10 pmol/L	0,5 pmol
Taq polimerase	0,2	5U/µL	1 U
DNA	2	50 ng/µL	4 ng
Água ultra pura	12,8	–	–
Total	25 µL		

Para cada reação de PCR, além das amostras de DNA extraídas do processo de fermentação, foi realizada também uma reação de controle negativo, para o qual o DNA foi substituído por água ultrapura, e um controle positivo, contendo DNA de *E. coli* ATCC 25922.

Os produtos de amplificação (5 µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% preparados em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e as bandas amplificadas foram visualizadas em transiluminador UV (Ultra Lum) e comparadas às bandas do padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder Invitrogen).

3.2.8.3 Clonagem gênica

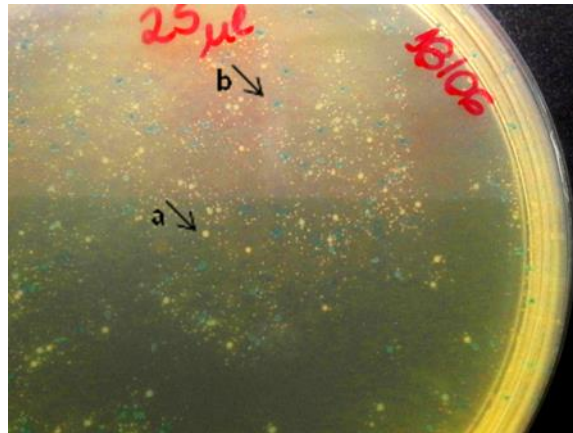
Para a construção das bibliotecas gênicas foram utilizadas células de *E. coli* TOP 10[®] (Invitrogen). A obtenção da competência celular se deu através de banho de cloreto de cálcio (50 mL de CaCl₂ 100mM/ Hepes 10 mM + 100 mL de células em fase *midlog*), centrifugadas a 4000 x *g* a 4 °C, de acordo com Sambrook e Russell

(2001). O precipitado celular foi ressuspensão em 2 mL de CaCl₂ 100 mM + glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL foram congeladas em freezer -80 °C até a etapa de transformação.

O DNA amplificado (fragmento do gene RNAr 16S) foi ligado ao vetor utilizando-se o kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen), de acordo com orientações do fabricante.

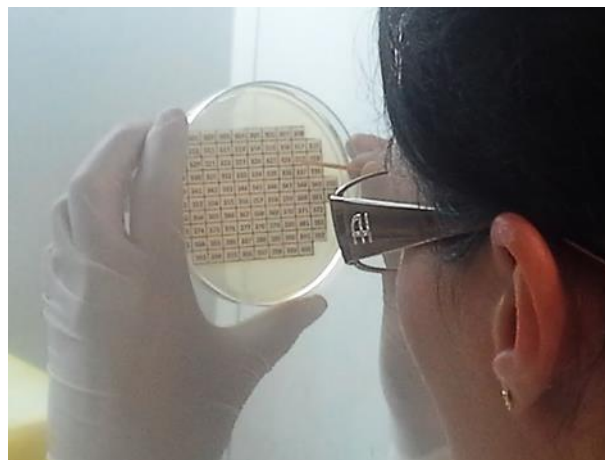
A transformação celular de *E.coli* foi realizada por choque térmico, conforme Sambrook e Russell (2001). Após a etapa de transformação, as células foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) +X-Gal 4% (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) 1 mL/L + IPTG 1 M (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 400 µL/L + ampicilina (100 mg/mL), incubadas a 37 °C por 16 horas, e em seguida os transformantes selecionados pelo método de triagem azul/branca. (Fig.8). A transformação de células com DNA extraído das fermentações com fubá foi infrutífera, não produzindo colônias transformantes. Assim, os dados apresentados na seção “Resultados e Discussão” referem-se às bibliotecas de glicose e feno de alfafa. Colônias contendo inserto (brancas) foram selecionadas e repicadas com o auxílio de palitos estéreis para outra placa de petri contendo meio LB + ampicilina + X-Gal + IPTG para a confirmação das células transformadas. Nesse processo, as colônias receberam uma identificação numérica (Fig. 9) e foram incubadas novamente a 37 °C por 16h. Após essa confirmação, os clones contendo inserto foram transferidos para placas tipo Masterblock contendo 900 µL de meio de cultura LB líquido + ampicilina (100mg/mL). Os clones foram incubados a 37 °C por 18h em estufa agitadora shaker (Marconi, MA 420), com rotação de 200 rpm, sendo 100 µL das células transferidas para placas contendo 96 poços, e adicionados 100 µL de glicerol 50% para criopreservação. As placas tipo Masterblock contendo o volume restante das culturas foram estocadas em freezer -80 °C para posterior extração do DNA plasmidial.

Figura 8: Placa de petri (LB + IPTG + X-Gal + Amp) contendo células bacterianas clonadas.



Destaque com setas apontando para a) colônia com inserto (branca); e b) colônia sem inserto (azul).

Figura 9: Confirmação das colônias transformadas por repique em placa de petri numerada, contendo ágar LB + IPTG + X-Gal.



3.2.8.4 Extração de DNA plasmidial (MINIPREP)

As placas contendo as células clonadas foram repicadas em placas tipo masterblock de 96 poços, contendo 900 µL de meio LB líquido + ampicilina (100 mg/mL) e incubadas a 37 °C em estufa agitadora shaker a 200 rpm por 18h.

O DNA plasmidial das células após crescimento foi extraído de acordo com Sambrook e Russell (2001). A DNA extraído foi ressuspensão em 30 µL de água ultrapura estéril, a placa foi selada com adesivo próprio e mantida em temperatura ambiente por cerca de 1h para a ressuspensão total do material genético. Após esse período, a placa contendo DNA plasmidial foi estocada em freezer a -20 °C.

3.2.8.5 Reação de sequenciamento

Para a realização da reação de sequenciamento, utilizou-se 1 a 5 µL do DNA plasmidial, previamente extraído, de acordo com a qualidade das bandas geradas, verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Adicionou-se 4 µL de reativo Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit da GE Life Science (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões) e 1 µL de iniciador direto ou reverso M13 (10 pmol/µL), totalizando um volume final de 10 µL. Os iniciadores utilizados continham as seguintes seqüências: M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG -3') e M13R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC -3').

A reação foi realizada em termociclador MJ Research, modelo PTC-200, com amplificação em 30 ciclos, com desnaturação a 95 °C por 20 s, hibridização a 50 °C por 15 s e extensão a 60 °C por 1 min.

Após a reação de sequenciamento, o produto obtido foi purificado por precipitação com acetato de amônia 7,5 M (Somerville et al., 1989), e, em seguida, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de tampão de amostra (loading buffer for MegaBACE), e armazenadas em freezer a -20 °C até o momento do sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas pelo sequenciador automático MegaBace 1000. Os parâmetros de injeção dos fragmentos de PCR no sequenciador foram de 2 kV por 60 s, e os parâmetros durante a corrida eletroforética foram de 7 kV por 250 min a 25 °C.

3.2.8.6 Análise das sequências RNAr 16S

Os eletroferogramas gerados pelo MegaBace foram visualizados com uso o software Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd), e as sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas na base de dados RDP (Ribosomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu>), com uso do algoritmo Classifier (Wang et al., 2007), Release 11, Update 3 e *threshold* de 80%. As sequências foram analisadas utilizando o 16S rRNA training set 14. As amostras também foram comparadas com o banco de dados GenBank, utilizando o algoritmo de busca *nucleotide blast* com os parâmetros *default* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2.9 Análise estatística

As análises estatísticas para as variáveis pH, N-NH₃ e AGCC foram realizadas com uso do programa Statgraphics XVI, comparando tempo de incubação, tipo de dieta e temperatura. Utilizou-se o método de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado sempre que a hipótese de nulidade foi rejeitada. Por tratar-se de testes paramétricos, pressupondo-se que houvesse homocedasticidade (variâncias homogêneas), o teste de Levene foi aplicado. Médias de grupos não homogêneos foram comparadas por meio do teste de Bonferroni, considerado mais apropriado nesses casos, por reduzir a probabilidade de se cometer um erro tipo I, que consiste em aceitar a hipótese de nulidade quando ela deveria ser rejeitada.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados representam as médias dos dois experimentos (out/13 e fev/14), considerados repetições. O *pool* de conteúdo intestinal apresentou valor de pH de 7,7 e 7,5, na primeira e segunda coletas, respectivamente. Todas as incubações, com os diferentes tratamentos, também contaram com frascos de

controle negativo, caracterizados por conterem os mesmos compostos que os demais, porém sem adição de conteúdo intestinal.

Todos os parâmetros analisados (pH, N-NH₃, AGCC) a partir de amostras dos controles negativos mantiveram-se inalterados entre o tempo 0h e 48h, indicando que não houve crescimento microbiano causado por contaminação (dados não apresentados).

3.3.1 Análises bromatológicas dos ingredientes

Os resultados das análises de matéria seca (MS), cinzas (CZ), proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos das fontes de carboidratos (feno de alfafa e amido de milho comercial) são apresentados na Tabela 4. Os valores apresentados estão de acordo com o esperado para as amostras analisadas.

Tabela 4: Porcentagem de matéria seca (MS), cinzas (CZ), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e proteína bruta (PB) de amostras de feno de alfafa e fubá.

	MS (%)	CZ (%)	FDA (%)	FDN (%)	PB (%)
Feno de alfafa	90,17	7,36	40,03	73,81	8,41
Fubá	88,01	0,55	1,14	3,09	6,33

3.3.2 Análises de pH

Os valores médios de pH obtidos nas fermentações realizadas utilizando três fontes de carboidratos (glicose, fubá e feno) são apresentados na Figura 10.

Observou-se a acidificação do meio no decorrer do tempo de fermentação, nas três temperaturas analisadas, tanto para a glicose como para o fubá.

Na fermentação de glicose, o pH variou em média, de 6,8 a 6,6, entre 0h e 48h; na amostra de feno, o pH se manteve próximo da neutralidade (6,9) e na amostra de fubá, o pH variou, em média, de 6,8 a 5,9 no mesmo período de tempo (Tabela 6). O uso de bicarbonato em sistemas de incubação *in vitro* possui capacidade de tamponar os meios de cultivo e, mesmo em pH abaixo de 6,0, consegue prevenir declínios futuros nos valores desse parâmetro durante o processo de fermentação (Terry et al., 1969). Os valores obtidos nos diversos tratamentos, variando de 5,7 a 6,9, demonstram que o poder tampão do meio foi suficiente.

Estudos *in vitro* baseados em fermentação de ruminantes sugerem que o pH abaixo de 6,0 pode inibir as bactérias fermentadoras de celulose, diminuindo assim a síntese de proteína microbiana. No entanto, a queda de pH favorece o crescimento de bactérias amilolíticas. É sugerido, também, que o pH ótimo para o metabolismo da amilase seja em torno de 5,6 (Arcuri et al., 2011).

O pH médio do conteúdo intestinal da carpa capim amostrada para as incubações foi de 7,6, o que sugere a presença de um ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias celulolíticas e/ou baixo nível de fermentação no órgão.

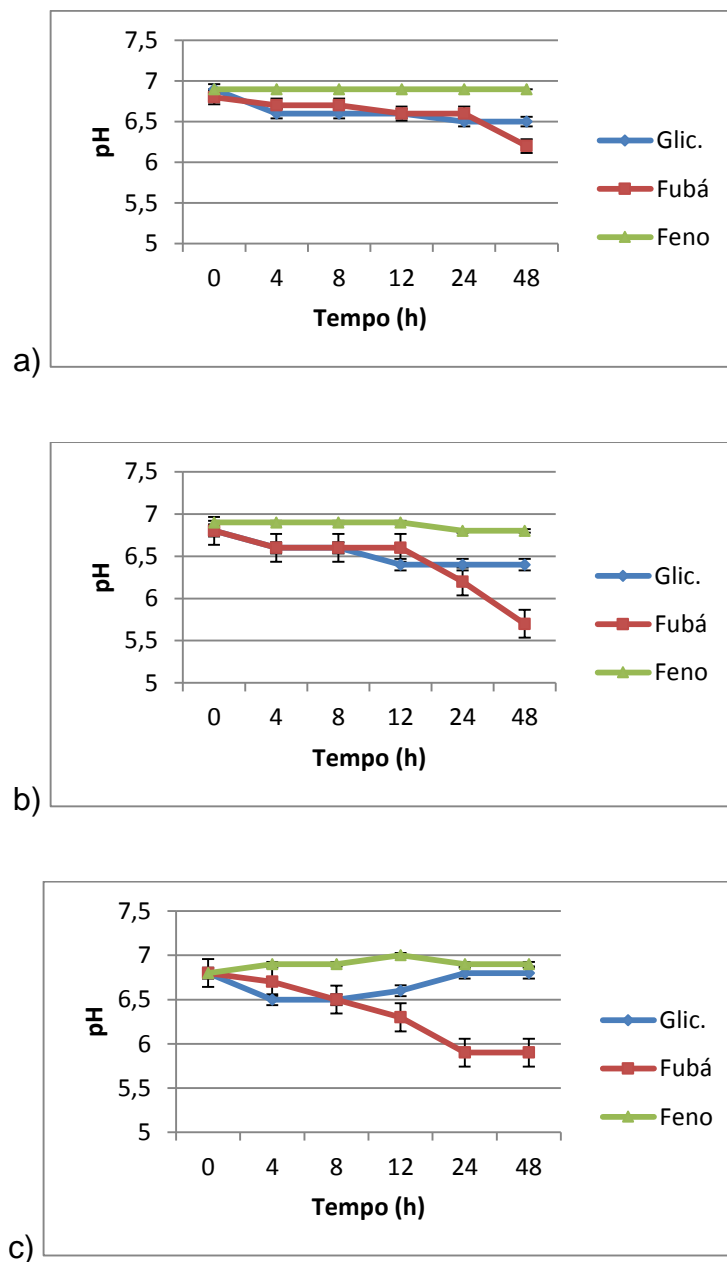
A curva de declínio de pH dos frascos com glicose apresentou ponto mínimo nos tempos de 24h, 12h e 4h para as temperaturas de 18 °C, 26 °C e 37 °C, respectivamente. Sendo a glicose prontamente disponível para o metabolismo microbiano, o aumento da temperatura promove aceleração do metabolismo, o que explica esse comportamento.

Na temperatura mais elevada (37 °C) observou-se aumento do pH entre 8h e 48h, sugerindo que a glicose foi totalmente consumida entre 4 e 8 horas. A 26 °C, essa mesma condição ocorreu entre 12 e 24 horas.

O declínio de pH dos frascos com fubá apresentou valor mínimo no tempo de 48h para as temperaturas de 18 °C e 26 °C e no tempo 24h para a temperatura de 37 °C, demonstrando novamente que a temperatura acelera o metabolismo microbiano. Na temperatura de 37 °C é razoável deduzir que o amido foi consumido em 24h de incubação e a manutenção do pH entre os tempos 24h e 48h pelo é resultado do poder tampão do meio (fig. 10).

O tratamento de feno manteve o pH neutro (7,0 a 6,8) nas três temperaturas avaliadas. O metabolismo lento pode ser justificado pela dificuldade da microbiota em degradar material com alto teor de fibra (FDA e FDN).

Figura 10: Variação do pH no decorrer de 48 h de fermentação, de amostras de diferentes fontes de carboidratos incubadas com conteúdo intestinal de carpa capim a 18 °C (a), a 26 °C (b) e a 37 °C (c).



O valor médio do pH dos frascos entre os tratamentos, agrupando-se todas as temperaturas e tempos de incubação, foi menor no tratamento com fubá, conforme Tabela 5. Estes dados podem ser explicados pelo fato do frasco com fubá ter recebido maior aporte de carboidratos degradáveis (amido), na quantidade de 0,560 g/frasco, enquanto que no de glicose, essa quantidade foi de 0,280 g/frasco. No caso do feno, o aporte também foi de 0,560 g/frasco, porém de um material menos degradável, com elevado teor de FDN (Tabela 4).

Tabela 5: Valores médios de pH entre os tratamentos glicose, fubá e feno de alfafa, agrupando-se todas as temperaturas e todos os tempos de incubação.

Tratamentos	pH (média)
Glicose	6,63b
Fubá	6,44a
Feno	6,86c

Letras distintas representam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%.

As análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) do pH em relação ao tempo de fermentação no tratamento de feno, mas houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o pH do tempo 0h e os demais tempos avaliados no tratamento de glicose. O tratamento de fubá apresentou diferença significativa entre o tempo 4h, quando comparado com os tempos 24h e 48h e o tempo 0h apresentou diferença significativa entre os demais tempos avaliados (Tabela 6).

Não houve diferença significativa de pH entre as diferentes temperaturas avaliadas (18 °C, 26 °C e 37 °C) no tratamento de feno, já no tratamento de glicose houve diferença significativa de pH entre as temperaturas de 26 °C e 37 °C, e para o tratamento de fubá houve diferença significativa entre as temperaturas de 18 °C e 37 °C (Tabela 7). Como mencionado anteriormente, esses dados demonstram que a temperatura acelera o metabolismo microbiano nos tratamentos contendo glicose e fubá, não exercendo influência no tratamento contendo feno.

O nível de acidificação das amostras demonstrou que o sistema de fermentação *in vitro* manteve condições favoráveis para o crescimento bacteriano para as diferentes dietas testadas durante o tempo de fermentação avaliado, demonstrando que o poder tampão da solução basal foi adequado.

Tabela 6: Valores de pH de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, em função do tempo, agrupando-se as diferentes temperaturas de incubação.

Tratamento	Tempo de incubação					
	0h	4h	8h	12h	24h	48h
Glicose	6,84b (0,005)	6,62a (0,03)	6,61a (0,02)	6,56a (0,07)	6,53a (0,08)	6,66a (0,06)
Fubá	6,87c (0,01)	6,69 bc (0,03)	6,57b (0,07)	6,47b (0,1)	6,15a (0,18)	5,91a (0,14)
Feno	6,91a (0,02)	6,87a (0,02)	6,86a (0,02)	6,88a (0,02)	6,8a (0,03)	6,87a (0,02)

Letras distintas na mesma linha representam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%. Os números entre parênteses representam o valor do erro padrão.

Tabela 7: Valores de pH de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, entre diferentes temperaturas, agrupando-se os diferentes tempos de incubação.

Tratamento	Temperatura de incubação		
	18 °C	26 °C	37 °C
Glic.	6,64ab (0,05)	6,57a (0,06)	6,69b (0,04)
Fubá	6,6b (0,1)	6,39ab (0,17)	6,33a (0,17)
Feno	6,9a (0,02)	6,84a (0,02)	6,87a (0,01)

Letras distintas na mesma linha representam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%. Os números entre parênteses representam o valor do erro padrão.

3.3.3 Análises de N-NH₃

As concentrações médias de N-NH₃ encontradas nesse estudo variaram entre 2,47 a 2,97, 2,19 a 3,18 e de 2,2 a 3,0 mg/100mL de fluído intestinal para o tratamento de glicose, nas temperaturas de 18 °C, 26 °C e 37 °C, respectivamente. Para o tratamento de fubá, foi de 2,19 a 2,68, 2,39 a 2,64 e de 2,5 a 3,45 mg/100mL nas temperaturas de 18°C, 26 °C e 37 °C, respectivamente. Para o tratamento de feno, foi de 2,25 a 3,63, 2,37 a 4,05 e de 2,36 a 4,47 mg/100mL nas temperaturas correspondentes entre 0h e 48h de incubação (Fig. 11). Cabe destacar que para garantir um teor mínimo fisiológico de amônia para bactérias e que assimilam esse composto e que poderiam estar presentes no intestino de carpa capim, foi adicionado NH₄Cl aos frascos de fermentação antes da inoculação.

Os dados da literatura a respeito da concentração de N-NH₃ produzida pela microbiota intestinal de peixes, seja no animal ou em sistemas *in vitro* são escassos (Lennhouwers et al., 2008), não havendo informações sobre esse parâmetro para peixes herbívoros.

A concentração de amônia (NH₃) encontrada em fermentação *in vitro* do conteúdo intestinal de tilápia e robalo em tratamento contendo glicose foi de 4,6 e 3,28 mg/100mL/peso de matéria orgânica, respectivamente. Em tratamento contendo amido de trigo, a concentração de NH₃ foi de 5,51 mg/100mL para tilápia e 5,32 mg/100mL para robalo. Já em tratamento contendo arabinosilano, a concentração de NH₃ observada foi de 6,36 e 5,15 mg/100mL para tilápia e robalo, respectivamente (Lennhouwers et al., 2008). Os dados obtidos no presente estudo no tratamento contendo glicose na temperatura de 26 °C foram próximos aos obtidos para o robalo (2,63 mg/100mL) após 48h de fermentação. O mesmo não ocorreu no tratamento com fubá, quando comparado com amido de trigo (2,63 mg/100mL) e no tratamento de feno de alfafa, quando comparado com arabinosilano (3,08 mg/100mL). No entanto, além da diferença entre a composição das dietas entre os estudos, deve-se observar que o presente trabalho avaliou a produção de N-NH₃ até 48h, enquanto Leenhouwers e colaboradores realizaram uma incubação de 168 horas de duração, o que poderia justificar uma maior concentração de N-NH₃ pelo autor citado.

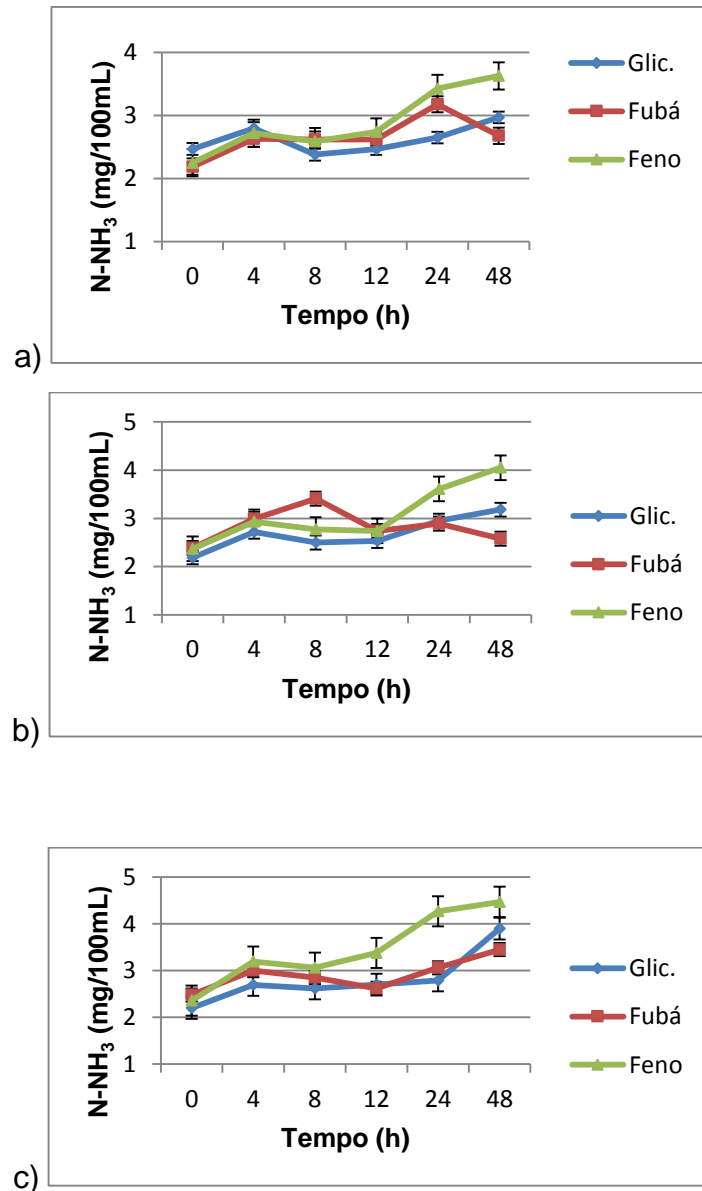
Entre 4h e 8h de incubação, ocorreu um declínio na concentração de N-NH₃ no tratamento com glicose, nas três temperaturas analisadas, sugerindo que a

proteína contida no meio foi degradada. A partir de 8h de incubação, a concentração de N-NH₃ se eleva novamente, sugerindo que, a partir desse ponto a produção de amônia se deve ao metabolismo de proteína microbiana. O mesmo comportamento é observado no tratamento com feno de alfafa. Porém, na temperatura de 26 °C a concentração de N-NH₃ volta a se elevar após 12h de incubação. No tratamento de fubá, a concentração de N-NH₃ decresce em 8 h de incubação na temperatura de 18 °C e em 12h na temperatura de 26 °C e volta a se elevar após esse período de tempo nas duas temperaturas citadas, já na temperatura de 37 °C, o declínio ocorre em 8h de incubação, demonstrando que a elevação da temperatura acelera o metabolismo de degradação de proteína (Fig. 11).

Usando inóculo intestinal de tilápia, a fermentação dos carboidratos em experimento *in vitro* ocorreu entre 7h e 31h de incubação; com inóculo de robalo europeu, esse processo ocorreu entre 12h e 26h em temperatura de incubação de 28 °C e 25 °C, respectivamente (Lennhouwers et al., 2008). Com base nos resultados de N-NH₃ apresentados neste trabalho, pode-se sugerir que a fermentação de carboidratos pela microbiota de carpa capim ocorreu pelo menos no período de 48h para os tratamentos de glicose e feno nas temperaturas de 18 °C, 26 °C e 37 °C. No tratamento de fubá, a fermentação ocorreu entre 2h e 12h, em incubação à 18 °C e 26 °C e pelo menos no período de 48h em incubação a 37 °C. Um maior tempo de incubação do conteúdo intestinal de carpa capim somado aos carboidratos testados poderia contribuir para a visualização do ponto final de fermentação para essas fontes de carbono.

A maior concentração de N-NH₃ foi produzida pelo tratamento com feno de alfafa, em todas as temperaturas avaliadas (Tabela 9), o que pode ser justificado pela maior quantidade de proteína bruta disponível nessa dieta (Tabela 4). Todos os tratamentos apresentaram maior produção de N-NH₃ na temperatura de 37 °C (Fig. 11). Os resultados encontrados justificam-se pelo fato de que a produção de N-NH₃ é influenciada pela elevação da temperatura (Randall e Wright, 1987).

Figura 11: Concentração de N-NH₃ no decorrer de 48h de fermentação de amostras de diferentes fontes de carboidratos incubadas com conteúdo intestinal de carpa capim a 18 °C (a), a 26 °C (b) e a 37 °C (c).



As análises estatísticas demonstraram que houve diferença significativa ($P < 0,05$) na produção de N-NH₃ no decorrer do tempo de fermentação nos tratamentos contendo glicose e feno. A concentração de amônia no tempo 48h apresentou diferença significativa quando comparada com os tempos 0h, 4h 8h e 12h no tratamento de glicose (Tabela 8). Por se tratar de uma fonte de carboidrato

prontamente digerível, a glicose pode ter contribuído para o metabolismo de proteína microbiana no decorrer do tempo de fermentação, explicando a alta a elevação nos níveis de N-NH₃ após 48h de incubação.

O tratamento com feno de alfafa apresentou diferença significativa entre os tempos 0h e 24h e entre 0h e 48h, além de diferença entre os tempos 4h e 8h em relação ao tempo de 48h (Tabela 8), demonstrando uma degradação mais lenta em relação às demais dietas por se tratar de matéria vegetal e apresentar alta porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina (73,81% de FDN), sendo, portanto, mais difícil de ser degradada (Tabela 4). Já o tratamento de fubá não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) na produção de N-NH₃ entre os tempos de fermentação analisados (Tabela 8). No entanto, não houve diferença significativa na concentração de N-NH₃ entre as temperaturas testadas para todas as dietas analisadas (Tabela 9).

Embora a análise da concentração de N-NH₃ intestinal seja escassa em peixes e outros animais não ruminantes, os dados encontrados neste estudo demonstram que a microbiota intestinal de carpa capim possui capacidade de degradar fontes nitrogenadas nas diferentes dietas analisadas.

Tabela 8: Concentrações de N-NH₃ (mg/100mL) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, em função do tempo, agrupando-se as diferentes temperaturas de incubação.

Tratamento	Tempo de incubação					
	0h	4h	8h	12h	24h	48h
Glic.	2,2a (0,01)	2,6a (0,02)	2,5a (0,07)	2,58a (0,07)	2,74ab (0,06)	3,27b (0,03)
Fubá	2,38a (0,1)	2,58a (0,09)	2,64a (0,15)	2,68a (0,03)	2,94a (0,08)	2,81a (0,3)
Feno	2,4a (0,09)	2,89ab (0,16)	2,77ab (0,13)	3,15abc (0,28)	3,59bc (0,2)	3,93c (0,22)

Letras distintas na mesma linha representam diferença significativa ($P< 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%. Os números entre parênteses representam o valor do erro padrão.

Tabela 9: Concentrações de N-NH₃ (mg/100mL) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, entre diferentes temperaturas, agrupando-se os diferentes tempos de incubação.

Tratamento	Temperatura de incubação		
	18 °C	26 °C	37 °C
Glic.	2,53a (0,09)	2,63a (0,18)	2,78a (0,31)
Fubá	2,55a (0,13)	2,63a (0,06)	2,84a (0,12)
Feno	2,83a (0,2)	3,08a (0,22)	3,45a (0,27)

Letras distintas na mesma linha representam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%. Os números entre parênteses representam o valor do erro padrão.

3.3.4 Análises de AGCC

Os valores de concentração média dos ácidos graxos avaliados após 48h de incubação em temperatura de 26 °C dos tratamentos de glicose, fubá e feno são demonstrados na Tabela 11. A amostra de conteúdo intestinal (não fermentada) apresentou concentrações médias de 9,04 mM, 2,05 mM, 0,21 mM e 0,13 mM para acético, propiônico, butírico e iso-valérico, respectivamente.

A concentração de AGCC observada após 48h de fermentação apresentou maior produção de ácido acético, seguido por propiônico e butírico no tratamento com feno, essa ordem de concentração corrobora com os dados citados por diversos autores (Mountfort et al., 2002; German, 2009; Rurangwa et al., 2009; Leenhouders et al., 2008). Já nos tratamentos de glicose e fubá, a ordem de produção de AGCC foi acético, butírico e propiônico.

O ácido butírico também foi o segundo ácido mais produzido em fermentação de conteúdo intestinal de tilápia quando fermentado com amido de trigo em sistema de fermentação tipo *batch* (Leenhouders et al., 2008). Segundo compilação de dados de Topping e Clifton (2001), carboidratos fermentáveis como o amido podem elevar

a concentração de ácido butírico, indicando que o substrato possui influência sobre a produção de ácidos graxos.

O acetato representou 53%, 45% e 59% da produção de ácidos após 48h de fermentação nos tratamentos glicose, fubá e feno, respectivamente (Fig. 12). A concentração total de ácido acético mensurada neste estudo nas fermentações contendo glicose, fubá e feno foram 15,4, 29,1 e 11,7 (mM), respectivamente.

Esse ácido graxo também foi o produto de fermentação mais abundante do intestino de perca zebra (*Hermosilla azurea*), com concentração de 15,25 mM na região posterior do intestino + ceco (Fidopiastis et al., 2006), sendo mais elevada que a concentração encontrada no trato intestinal de carpa capim neste estudo (9 mM). A elevada concentração de ácido acético encontrada em perca zebra foi associada a um número elevado de bactérias localizadas na região intestinal mencionada. No entanto, a contagem do número de bactérias intestinais de carpa capim não foi avaliada neste estudo.

A concentração total de ácido propiônico encontrada foi de 6,0 mM (glicose), 8,2 mM (fubá) e 6,1 mM (feno), representando 21%, 13% e 30%, respectivamente (Fig. 12). O propionato do conteúdo intestinal (2,0 mM) é correspondente à produção encontrada em outros peixes herbívoros (Clements et al., 1994; Mountfort et al., 2002).

A concentração total de ácido butírico foi de 6,6 mM (glicose), 26,1 mM (fubá) e 0,8 mM (feno), correspondendo a 23%, 41% e 4%, respectivamente (Fig. 12). Os resultados demonstram uma maior concentração de ácido butírico quando comparado com dados de fermentação *in vitro* utilizando conteúdo intestinal de robalo europeu e tilápia e dietas de carboidratos (amido de trigo, arabinosilano e glicose) (Leenhouders et al., 2008).

A composição da comunidade bacteriana presente no tratamento de fubá poderá ajudar a compreender a concentração mais elevada de ácido butírico presente nesse tratamento. No entanto, a identificação da microbiota fermentadora de fubá não foi realizada neste estudo.

As concentrações dos ácidos isobutírico e isovalérico foram pouco expressivas (<2 mM). Não houve detecção de ácido valérico em nenhum dos tratamentos avaliados.

A concentração de ácidos graxos totais encontradas após 48h de fermentação neste estudo foram superiores aos dados demonstrados por Leenhouders et al.

(2008) em estudo sobre fermentação *in vitro* tipo *batch* de robalo europeu e tilápia, utilizando fontes de carboidratos (glicose, grão de trigo, amido de trigo e arabinoxilano), no entanto, o tempo de fermentação analisado pelos autores foi de 168h. Pode-se sugerir que o tempo de incubação no estudo em questão tenha sido demasiadamente longo, ocasionando diminuição da população microbiana em decorrência da escassez de nutrientes e conseqüentemente a diminuição de produtos finais de fermentação.

A produção de gás gerada pelos frascos incubados à 37 °C foi mensurada utilizando-se seringa e agulha de 10 mL. A agulha foi introduzida na rolha dos frascos contendo fermentação e observou-se intensa produção de gás pelo deslocamento espontâneo do êmbolo da seringa. O processo foi repetido até que o gás fosse totalmente expelido, os valores foram anotados para todos os tempos de leitura e dietas avaliadas.

O volume máximo de 64 mL de gás foi observado no tempo 12h do tratamento de glicose, 52 mL no tempo 24h de fubá e 12 mL no tempo 24h de feno (Tabela 10). Comparando-se o ponto máximo da produção de gás com o ponto mínimo de pH (Fig. 10) em cada dieta analisada, observa-se que os pontos analisados se cruzam, demonstrando que a produção de gás é mais intensa quando há declínio de pH. O aumento ou estabilização do pH pode provocar diminuição ou encerramento da produção de gás, o que pode indicar o término do processo de fermentação.

Os valores da produção de gases medidos nas incubações a 37 °C corroboram com os dados de pH e AGCC que mostram uma fermentação mais intensa nos frascos contendo a dieta de fubá, seguido por glicose e feno (Tabela 10).

Tabela 10: Produção de gás (mL) nos frascos de fermentação contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, na temperatura de 37 °C no decorrer do tempo de incubação de 48h.

	0h	4h	8h	12h	24h	48h
Glic.	nd	nd	16	64	0	0
Fubá	nd	40	50	50	52	20
Feno	nd	8	8	8	12	0

Glic.: glicose, nd: não detectável

Figura 12: Proporção total de ácidos graxos produzidos no tratamento contendo glicose (a), fubá (b) e feno de alfafa (c), após 48h de incubação.

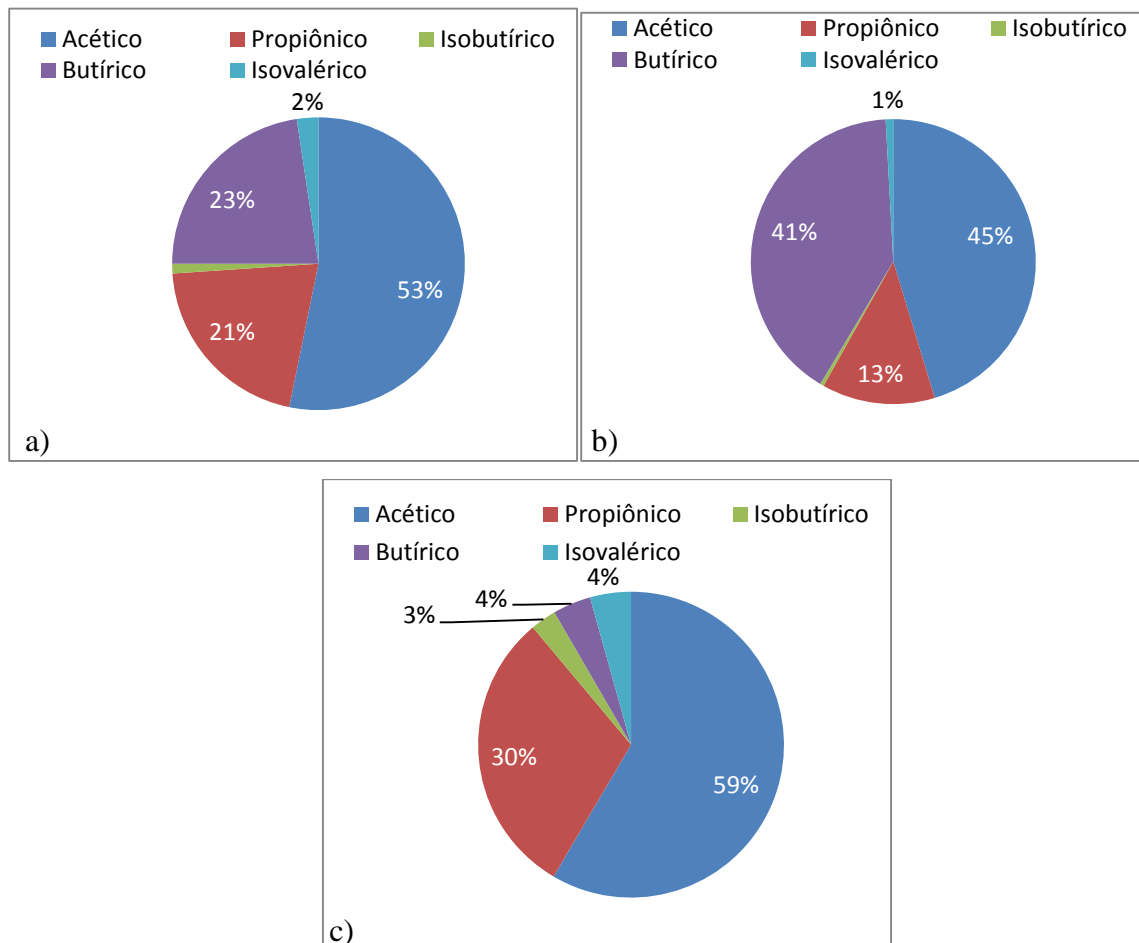


Tabela 11: Concentrações de AGCC (mM) de amostras retiradas dos frascos de fermentação, contendo diferentes fontes de carboidratos, inoculadas com conteúdo intestinal de carpa capim, na temperatura de 26 °C, entre diferentes tratamentos e tempos de incubação.

	Acético			Propiônico			Butírico		
	0h	8h	48h	0h	8h	48h	0h	8h	48h
Glic	6,2aB	15,39bB	15,44bA	1,72aA	2,04aA	6,01bA	0aA	0,18aA	6,57bB
Fubá	1,88aA	12,97bB	29,10cB	1,85aA	1,73aA	8,25bB	0aA	0,17aA	26,07bC
Feno	2,40aA	6,6bA	11,7cA	2,2aA	2,35aA	6,12bA	0aA	0,17aA	0,81bA

Letras minúsculas comparam entre tempos, letras maiúsculas comparam entre tratamentos. Letras distintas representam diferença significativa ($P < 0,05$). Análise estatística realizada pelo teste de variância, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 5%.

Houve diferença significativa na concentração de ácido acético entre o tempo 0h e os demais tempos no tratamento de glicose, nos tratamentos com fubá e feno houve diferença significativa da produção de acético no decorrer do tempo. O tratamento de glicose também apresentou diferença significativa na produção de acetato no tempo 0h quando comparado com os demais tratamentos, o que pode indicar erro experimental, sendo que a concentração de ácido acético representou mais que o dobro da produção desse ácido nas demais dietas antes dos frascos terem sido incubados em banho maria. Glicose e fubá produziram mais acetato no tempo de 8h quando comparado com feno, o que pode ser justificado pela dificuldade em se degradar o feno em relação às demais dietas.

O tratamento contendo fubá apresentou maior produção de acetato em 48h quando comparado com os demais tratamentos, o que pode ter sido ocasionado pela composição da microbiota existente, no entanto, não foi realizada a identificação dessa população. A concentração de acetato produzido pela dieta de feno praticamente dobrou do tempo 8h para o tempo 48h (6,6 mM para 11,7 mM), esse salto na produção de acetato pode ser decorrente da alta concentração de espécies do gênero *Cetobacterium*, e de espécies do gênero *Clostridium*, que produzem acetato como produto final de fermentação.

A concentração de ácido propiônico apresentou diferença significativa no tempo de 48h em relação aos demais tempos de incubação para todos os tratamentos. O tratamento com fubá apresentou diferença significativa na concentração de propionato em 48h de incubação, quando comparado com os demais tratamentos. O propionato pode ser formado a partir da descarboxilação do succinato ou pela via do acrilato, onde o lactato é reduzido a propionato (revisado por Besten et al., 2013), e após 48h de incubação esse ácido poderia ter sido gerado por uma dessas vias, no entanto, a produção de lactato e succinato não foi avaliada neste estudo.

Houve diferença significativa na concentração de ácido butírico no tempo 48h em relação aos demais tempos de incubação para todos os tratamentos, o mesmo ocorreu na comparação entre tratamentos (Tabela 11). O filo Firmicutes produz ácido butírico como produto final de fermentação (Besten et al., 2013), esse filo foi predominante na dieta de glicose, podendo justificar o aumento na produção desse ácido após 48h de incubação. Embora a dieta de feno também contenha uma participação expressiva do filo Firmicutes, a baixa produção de ácido butírico pode ter sido decorrente da concentração de bactérias do filo Fusobacteria, produtor de acetato. O número elevado de bactérias pertencentes a esse filo (gênero *Cetobacterium*) pode ter inibido a produção de butirato pelas bactérias constituintes do filo Firmicutes.

Além disso, deve-se considerar que as concentrações de ácidos graxos mensuradas neste experimento representam apenas a sobra do que foi realmente produzido pela microbiota, uma vez que o produto de fermentação de uma espécie pode servir como substrato para o metabolismo de outra.

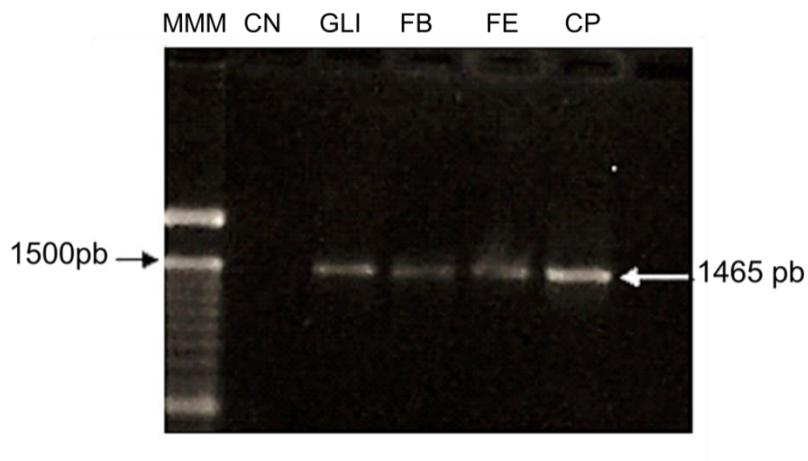
As concentrações de AGCC produzidas neste trabalho indicam que a microbiota intestinal de carpa capim possui capacidade de fermentar carboidratos e que o tempo de incubação e a dieta influenciam na quantidade e na composição dos produtos finais de fermentação, respectivamente.

3.3.5 Análises moleculares

3.3.5.1 Amplificação do gene RNAr 16S

Os fermentados das três dietas foram coletados após 48 h de incubação e tiveram seu DNA extraído e amplificado por PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 1465pb. As bandas geradas por esses fragmentos foram visualizadas em gel de agarose 1,5 % (Fig. 13).

Figura 13: Gel de agarose contendo fragmentos do gene RNAr 16S, amplificados por PCR a partir do DNA total de amostras de frascos de fermentação com glicose, fubá e feno de alafafa após 48h de incubação.



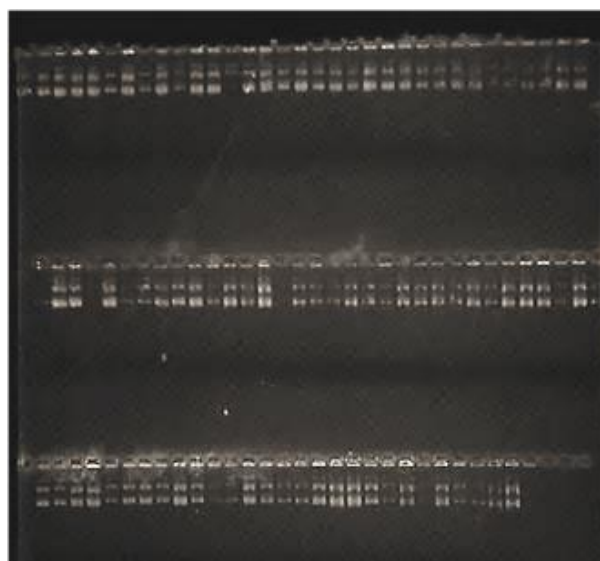
MMM: marcador de massa molecular, CN: controle negativo, GLI: glicose, FB: fubá, FE: feno, CP: Controle Positivo, pb: pares de base.

3.3.5.2 Clonagem gênica e identificação molecular dos clones

Foram obtidos 300 clones viáveis a partir da amostra fermentada com glicose e 800 da amostra fermentada com feno, no entanto, não foi possível realizar a clonagem do material genético bacteriano da amostra de fubá devido ao insucesso na etapa de transformação das células de *E. coli* para essa amostra em particular.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído e visualizado em gel de agarose 1% (Fig. 14). Destes, foram selecionadas 96 amostras de cada tratamento para a realização de sequenciamento genético, sendo que o critério utilizado para a escolha dos representantes foi a intensidade da banda gerada no processo de eletroforese em gel das amostras de DNA plasmidial.

Figura 14: Gel de agarose contendo DNA plasmidial extraído de células de *E. coli* transformadas com fragmentos de DNA, produto de amplificação obtido a partir do DNA total de amostras dos frascos de fermentação contendo glicose e feno.



As sequências válidas, ou seja, os eletroferogramas que apresentaram qualidade de sequenciamento (22 para glicose e 68 para feno) fornecidas pelo sequenciador automático Mega Bace tiveram, em média 700pb e foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados GenBank e RDP. Considerou-se, nesse estudo, identidade maior ou igual a 95% para gênero e 97% para espécie (Tindall et al., 2010) e a partir de 75% para filo (Tabela 12). Esse valor foi utilizado como critério para a identificação das bactérias encontradas neste estudo (Tabelas 13 e 14).

Os filios bacterianos encontrados, em ordem decrescente de ocorrência foram: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria nas amostras fermentadas

com glicose (Fig. 15) e Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e Actinobacteria nas amostras fermentadas com feno (Fig.16).

Tabela 12: Representação do número de sequências válidas para cada tratamento e identificação encontrada por categoria.

Tratamento	Sequências válidas	Filo	Gênero	Espécie
Glicose	26	14	8	4
Feno	68	53	11	4

Figura15: Representação dos filios bacterianos encontrados nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, após 48h de incubação.

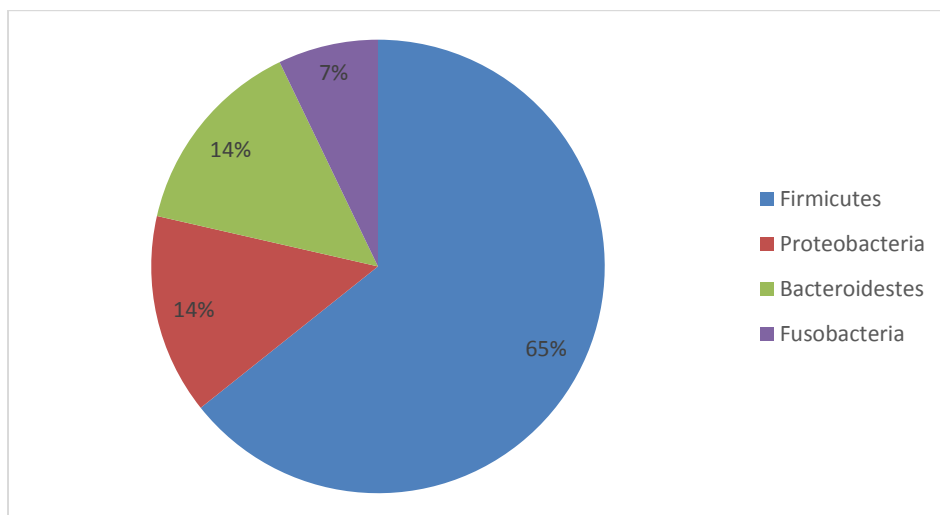
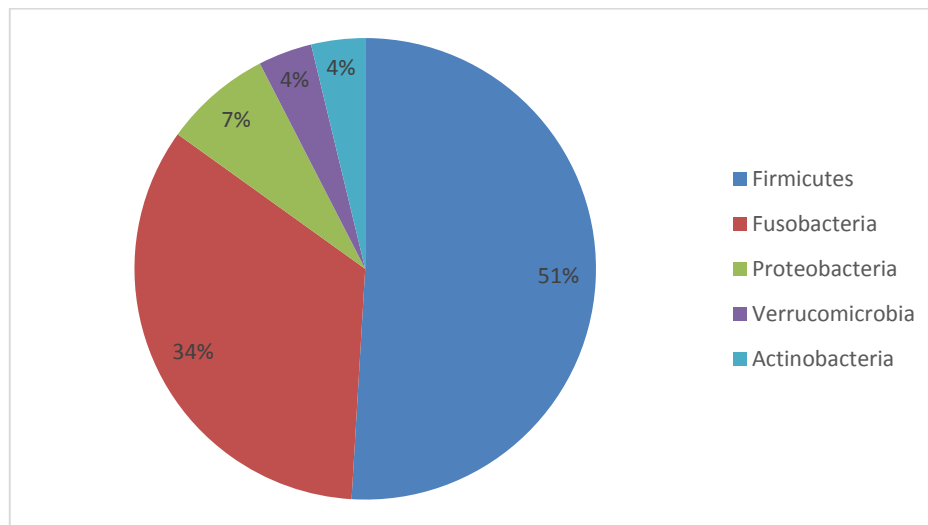


Figura16: Representação dos filos bacterianos encontrados nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alfafa, após 48h de incubação.



O filo Firmicutes aparece nesse estudo com dominância de 65%, no tratamento de glicose, e 51% no tratamento de feno, contrariando dados da literatura, que apontam o filo Proteobacteria como sendo o predominante a habitar o conteúdo intestinal de carpa capim, quando cultivada em tanques de piscicultura e alimentadas com ração comercial e diferentes fontes vegetais (Han et al., 2010; Wu et al., 2012; Zhou et al., 2012). Deve-se observar, no entanto, que a incubação *in vitro* promovida no presente trabalho pode ter promovido o enriquecimento de determinadas populações. Outro fato a considerar é o espaço amostral, limitado a algumas dezenas de clones analisados.

O filo Proteobacteria apresentou um percentual de 14% no tratamento de glicose, aparecendo como o segundo filo mais abundante no tratamento em questão, porém menos expressivo no tratamento de feno (7%), ocupando o terceiro lugar em ordem de abundância. Esse filo também foi relatado como o segundo mais abundante na constituição da microbiota intestinal de catfish (*Ictalurus punctatus*), achigã (*Micropterus salmoides*) e bluegill (*Lepomis macrochirus*), com abundância variando entre 5 e 16% (Larsen et al., 2014).

Ao analisar a microbiota intestinal de carpa capim criadas em tanques de piscicultura, Zhou et al. (2012) observaram a presença de representantes do filo Fusobacteria, corroborando com os dados encontrados nesse ensaio.

As bactérias que compõem o filo Fusobacteria são classificadas como bacilos Gram negativos, não formadores de esporos e anaeróbios obrigatórios (Bennett e Eley, 1993). Essas tiveram uma representação significativa no tratamento de feno (34%), o que não ocorreu no tratamento de glicose, no qual apenas 7% dos microrganismos pertenceram a esse grupo. Uma porcentagem elevada de bactérias identificadas como integrantes do filo Fusobacteria foi encontrada em *L. macrochirus*, *M. salmoides* e *I. punctatus*, com representatividade de 82,6%, 90,6% e 94,9%, respectivamente (Larsen et al., 2014).

Ao analisar a microbiota intestinal de carpa capim criadas em tanques de piscicultura, Zhou et al. (2012) observaram a presença de representantes dos filios Fusobacteria e Actinobacteria, corroborando com os dados encontrados nesse ensaio. Essa observação pode indicar a influência do ambiente sobre a composição da microbiota, assim como sugerido por Ni et al. (2012).

A quantidade de bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria neste estudo foi pequena, representando apenas 4% do total de sequências obtidas no tratamento de feno, não sendo representada no tratamento de glicose. Esse filo também foi encontrado no conteúdo intestinal de carpa capim, representando cerca de 9% da composição do trato intestinal por Han et al. (2010), também presente no conteúdo intestinal no trabalho de Ni et al. (2014) e no ambiente ao qual a espécie habitava (água e sedimento de piscicultura) por Zhou et al. (2012).

Neste trabalho, a porcentagem de Verrucomicrobia foi de 4% nas amostras tratadas com feno, não sendo encontrado nas amostras tratadas com glicose. O filo Verrucomicrobia foi identificado no conteúdo intestinal dos peixes herbívoros marinhos *Naso tonganus* e *Pamacanthus sextriatus*, representando 0,45% da microbiota desses animais, neste estudo, foram analisadas também a constituição da microbiota intestinal de espécies de peixes onívoros e carnívoros, tanto de água doce quanto marinhos, nos quais o filo em questão não foi encontrado (Sullam et al., 2012).

A classe *Verrucomicrobiae* foi identificada no trato intestinal de carpa comum (*C. carpio* L.) e relacionada com o metabolismo de beta-glicanas de material vegetal (van Kessel et al., 2011). A presença de Verrucomicrobia nesse estudo, juntamente com os dados dos autores citados acima pressupõem que a microbiota intestinal de peixes pode ser influenciada pelo hábito alimentar (dieta vegetal), e que a porcentagem mais elevada encontrada neste trabalho, muito provavelmente seja em

decorrência das condições favoráveis ofertadas pelo sistema de fermentação utilizado.

A diversidade de gêneros foi mais acentuada nas amostras fermentadas com feno de alfafa em relação às fermentadas com glicose, que apresentou representantes de *Cetobacterium*, *Clostridium*, *Anaerosinus*, *Escherichia/Shigella*, *Hafnia*, *Peptostreptococcus*, *Proteocatella* e *Robinsoniella*. Já as amostras fermentadas com glicose apresentaram os gêneros *Eubacterium*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Cetobacterium*, sendo que os gêneros mais representativos foram *Eubacterium* (50%), *Pseudomonas* (20%) e *Clostridium* (20%) no tratamento contendo glicose e *Cetobacterium* (54%), *Clostridium* (19%) e *Anaerosinus* (7%) no tratamento contendo feno de alfafa (Figs. 17 e 18).

A diferença apresentada na diversidade entre as duas dietas analisadas pode representar influência da dieta sobre a microbiota, no entanto, a biblioteca da amostra fermentada com feno produziu um maior número de clones e a qualidade do sequenciamento também foi superior nesse tratamento, quando comparado com o tratamento de glicose, o que pode indicar que a qualidade do DNA extraído foi maior na amostra contendo feno.

Figura17: Representação dos gêneros bacterianos identificados nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, após 48h de incubação.

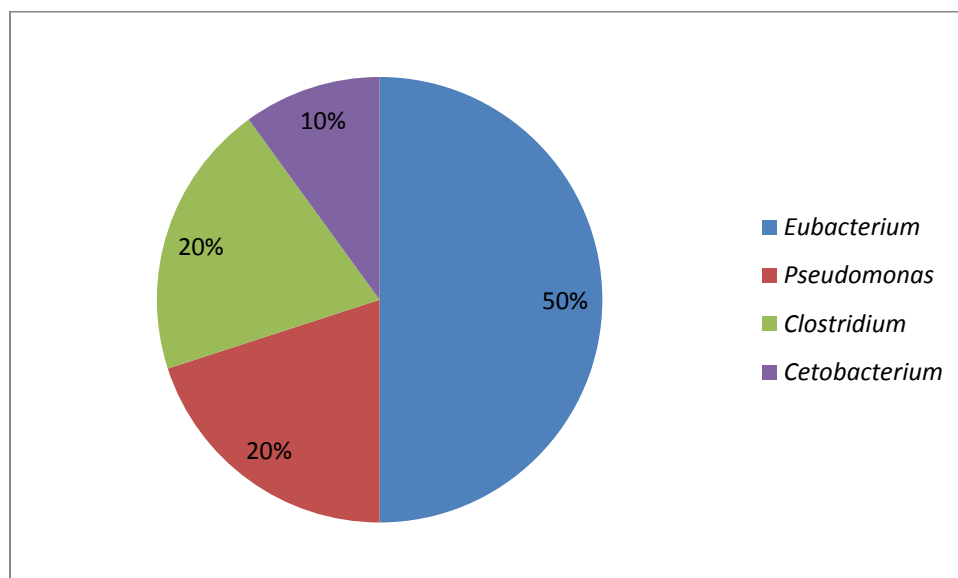
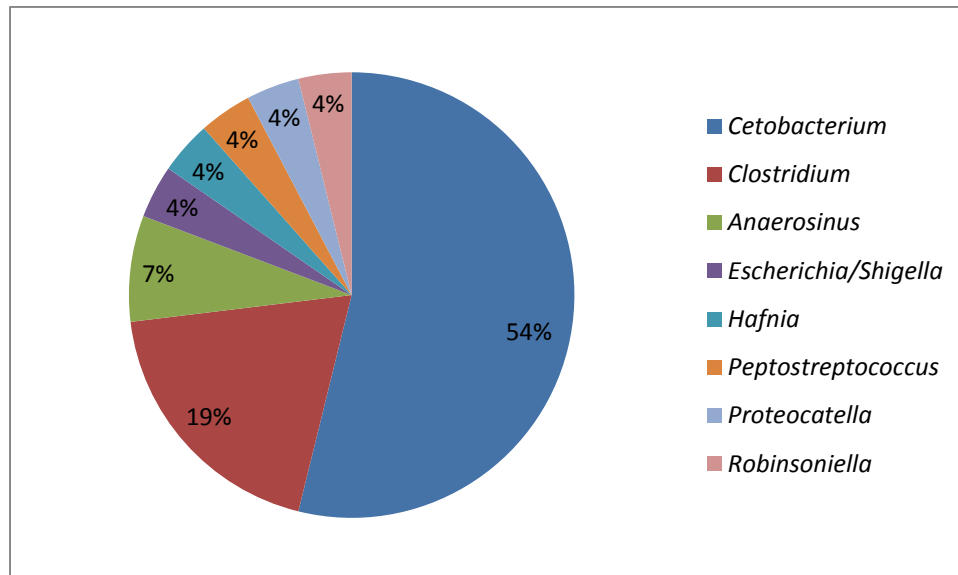


Figura18: Representação dos gêneros bacterianos identificados nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alfafa, após 48h de incubação.



Foram identificadas quatro espécies bacterianas distintas em cada tratamento, no entanto, a diversidade microbiana variou entre eles, não havendo a ocorrência da mesma espécie entre as dietas analisadas (Fig.19 e 20). As espécies identificadas foram *Eubacterium aggregans*, *Eubacterium* sp., *Clostridium butyricum* e *Pseudomonas* sp. no tratamento contendo glicose. No tratamento contendo feno foram identificadas as espécies bacterianas *Clostridium* sp., *Robinsoniella peorienses*, *Cetobacterium somerae* e *Hafnia alvei* (Tabela 13 e 14).

Figura19: Distribuição das espécies bacterianas presentes nas amostras fermentadas de frascos contendo glicose, inoculados com conteúdo intestinal de carpa capim, após 48h de incubação.

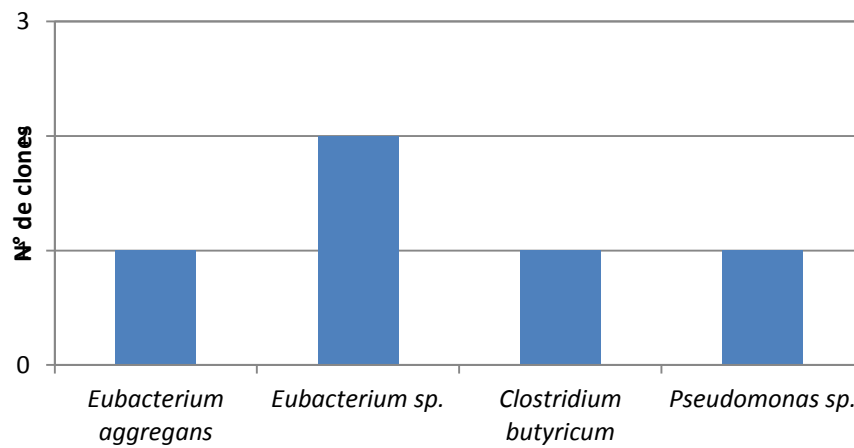


Figura 20: Distribuição das espécies bacterianas presentes nas amostras fermentadas de frascos contendo feno de alafafa, inoculados com conteúdo intestinal de carpa capim, após 48h de incubação.

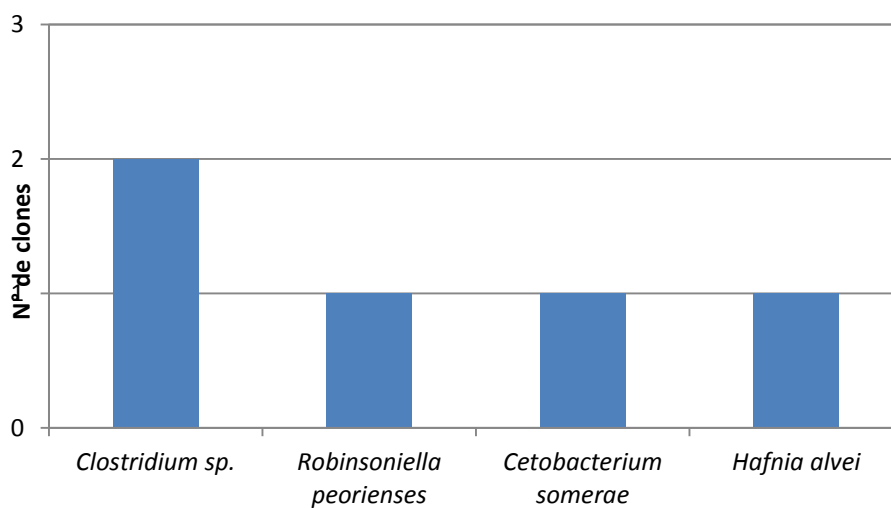


Tabela 13: Classificação das bactérias identificadas com uso da sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra contendo glicose após 48h de incubação.

Filo	Gênero	Espécie	Quantidade
Firmicutes	NI	NI	2
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium aggregans</i>	1
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium</i> sp.	2
Firmicutes	<i>Eubacterium</i>	NI	2
Firmicutes	<i>Clostridium Sensu Stricto</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	1
Firmicutes	<i>Clostridium Sensu Stricto</i>	NI	1
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	1
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	NI	1
Bacteroidetes	NI	NI	2
Fusobacteria	<i>Cetobacterium</i>	NI	1

NI: Não Identificado

Tabela 14: Classificação das bactérias identificadas com uso da sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra contendo feno de alfafa após 48h de incubação.

Filo	Gênero	Espécie	Quantidade
Firmicutes	NI	NI	17
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> sp.	2
Firmicutes	<i>Clostridium XI</i>	NI	2
Firmicutes	<i>Clostridium Sensu Stricto</i>	NI	1
Firmicutes	<i>Anaerosinus</i>	NI	2
Firmicutes	<i>Peptostreptococcus</i>	NI	1
Firmicutes	<i>Proteocatella</i>	NI	1
Firmicutes	<i>Robinsoniella</i>	<i>Robinsoniella peorienses</i>	1
Fusobacteria	NI	NI	3
Fusobacteria	<i>Cetobacterium</i>	<i>Cetobacterium somerae</i>	1
Fusobacteria	<i>Cetobacterium</i>	NI	14
Proteobacteria	NI	NI	2
Proteobacteria	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	1
Proteobacteria	<i>Escherichia/Shigella</i>	NI	1
Verrucomicrobia	NI	NI	2
Actinobacteria	NI	NI	2

NI: Não identificado

Pseudomonas foi considerada como a população dominante do trato gastrointestinal de juvenis de salmão atlântico (*Salmo salar* L.) (Navarrete et al., 2008),

encontrada colonizando o trato intestinal de carpa capim (Ni et al., 2012, Wu et al., 2012) além de ser encontrada em filés de carpa capim refrigerados, representando 3% da população bacteriana (Wang et al., 2014).

Eschbach et al. (2004) observaram que *Pseudomonas aeruginosa*, sob condições de crescimento anaeróbio, convertem o piruvato em lactato, succinato e acetato. O estudo demonstra ainda que o pH é considerado um fator limitante para a fermentação de piruvato por essa espécie e deve permanecer entre 6 e 7. *Pseudomonas* foi identificada na dieta contendo glicose, que manteve um pH entre 6,5 e 6,8, no entanto, não foi encontrada na dieta contendo feno, que manteve seu pH próximo da neutralidade. A identificação do gênero *Pseudomonas* neste estudo não atingiu o nível de espécie específica, e, portanto, não há como realizar comparações a respeito dos produtos fermentados por *P. aeruginosa*, por não haver certeza de que se tratam da mesma espécie bacteriana.

Clostridium butyricum é uma espécie estritamente anaeróbia, e através do processo de fermentação, produz hidrogênio, ácidos láctico, acético e butírico, CO₂ e etanol (Cai et al., 2011). *Clostridium* foi também encontrada no estudo de Wu et al. (2012) que avaliaram a composição e diversidade bacteriana intestinal de carpa capim e no trato gastrintestinal do peixe detritívoro *Panaque nigrolineatus* (McDonald et al., 2012).

Dados compilados por Papanikolaou et al. (2000), demonstram que *Clostridium butyricum* produz 1,3- propanodiol a partir da fermentação anaeróbia do glicerol, composto que pode ser utilizado para a produção de poliéster, poliuretano, lubrificantes e solventes pelo mercado industrial. Esses dados revelam o potencial biotecnológico dos microrganismos anaeróbios através da utilização de seus produtos finais de fermentação.

Eubacterium aggregans é uma espécie Gram positiva, homoacetogênica, anaeróbia estricta, não formadora de esporos, considerada importante na produção de biocombustível. Os produtos finais de fermentação produzidos por essa espécie são acetato, butirato, formato, lactato, H₂, CO₂ e etanol (Mechichi et al., 1998, Majors et al., 2008).

A espécie *Cetobacterium somerae*, identificada no tratamento contendo feno é uma bactéria que compõe a flora intestinal de peixes, anteriormente conhecida como *Bacteroides* tipo A, e reclassificada como *C. somerae* em 2008 por Tsuchiya e

colaboradores. Trata-se de uma espécie anaeróbia obrigatória, conhecida por produzir vitamina B12 (van Kessel et al., 2011) e acetato a partir de substratos compostos por peptídeos e carboidratos (Duncan et al., 2007).

C. somerae também foi encontrada por Larsen et al. (2014) na porção intestinal de espécies de peixes onívoros *I. punctatus*, *M. salmoides* e *L. macrochirus*, com abundância de 94,02%, 89,9% e 72,04%, respectivamente. *C. somerae* também foi identificada em *C. carpio* L. (van Kessel et al., 2011) e *Cetobacterium* sp. foi relatada como a espécie mais frequente no intestino de carpa capim criadas em tanques de piscicultura (Ni et al., 2012).

Robinsoniella peoriensis, uma nova espécie bacteriana, classificada em 2009 por Cotta e colaboradores, trata-se de bastonete Gram positivo, anaeróbio, fermentador de carboidratos como, por exemplo, glicose e celobiose, e tem como produto final de fermentação o acetato e o succinato. A espécie foi isolada de fezes de suínos e de feridas humanas profundas (Cotta et al., 2009) e identificada no intestino de ratos (Wohlgemuth et al. 2011).

Os microrganismos identificados neste estudo indicam a contribuição da microbiota intestinal na nutrição de carpa capim, em decorrência dos produtos finais de fermentação ofertados ao animal

As espécies bacterianas identificadas neste estudo são, na sua maioria anaeróbias estritas, com exceção da *Pseudomonas* sp. e da *Hafnia alvei* (anaeróbias facultativas), o que sugere que o sistema de fermentação *in vitro* utilizado manteve condições ideais de anaerobiose, permitindo a fermentação bacteriana proposta nesse ensaio.

As diferentes espécies identificadas nos dois tratamentos avaliados sugerem que a dieta pode exercer influência sobre a composição da microbiota intestinal de carpa capim.

3.4 CONCLUSÃO

As concentrações de N-NH₃ e AGCC e a intensa produção de gás observadas neste estudo indicam que a microbiota intestinal de carpa capim possui elevado potencial de fermentação de carboidratos em sistema de fermentação *in vitro*. Bactérias tipicamente fermentadoras de carboidratos solúveis e estruturais, notadamente do Filo Firmicutes, estão presentes no intestino dessa espécie e a diversidade bacteriana encontrada nas dietas de glicose e feno indicam que a dieta pode influenciar a composição da microbiota presente nesse órgão.

CAPÍTULO 4

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo denotam a importância do conhecimento sobre a microbiota intestinal de peixes. Através do entendimento do potencial fermentativo das bactérias presentes no intestino de carpa capim, estratégias de manipulação dessa comunidade microbiana podem ser desenvolvidas, a fim de possibilitar a degradação de alimentos com maior eficiência pelo organismo do animal, aumentando seu ganho de peso e diminuindo custos de produção.

Além disso, os produtos de fermentação gerados pelas espécies bacterianas identificadas podem ser de grande utilidade para a indústria biotecnológica. Etapas futuras incluindo o isolamento e caracterização das vias de fermentação das espécies isoladas podem gerar conhecimentos a serem aplicados na nutrição do animal, com o desenvolvimento de probióticos, ou ainda em outros setores da indústria de biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Tenth edition. Washington, 1965.
- Arcuri, PB, Lopes, FCF, Carneiro, JC. Microbiologia do rúmem. In: Berchielli, TT, Pires, AV, de Oliveira, SG. Nutrição de ruminantes. 2ª edição. Jaboticabal: Prol; 2011. 115-147.
- Bennett, KW, Eley, A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *Journal of Medical Microbiology*. 1993; 39: 246-254.
- Bergman, EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*. 1990; 70: 567-590.
- Besten, G, van Eunen, K, Groen, AK, Venema, K, Reijngoud, D, Bakker, BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54: 2325-2340.
- Blanchart, G, Durand, M, Barry, JL, Bouillier-Oudot, M, Jouany, JP. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans le l' étude des fermentations du rumen. *Annales de Zootechnie*. 1989; 38: 285-314.
- Cahill, MM. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*. 1990; 9: 21-41.
- Cai, G, Jin, B, Saint, C, Monis, P. Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *Journal of Biotechnology*. 2011; 155: 269-274.
- Caporaso, JG, Lauber, CL, Walters, WA, Berg-Lyons, D, Lozupone, CA, Turnbaugh, PJ, Fierer, N, Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequence per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108: 4516-4522.
- Chaney, AL, Marbach, EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 1962; 8: 130-132.

Chilton II, EW, Muoneke, MI. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: a North American perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1992; 2: 283-320.

Clements, KD. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. *Gastrointestinal Microbiology – Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. 1997. 156-198.

Clements, KD, Gleeson, VP, Slaytor, M. Short-chain fatty acid metabolism in temperate marine herbivorous fish. *Journal of Comparative Physiology B*. 1994; 164: 372-377.

Coles, LT, Moughan, PJ, Darragh, AJ. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*. 2005; 421-444.

Cotta, MA, Whitehead, TR, Falsen, E, Moore, E, Lawson, PA. *Robinsoniella peoriensis* gen. nov. sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit and a human clinical source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009; 59: 150-155.

Day, RD, German, DP, Manjakasy, JM, Farr, I, Hansen, MJ, Tibbetts, IR. Enzymatic digestion in stomachless fishes: how a simple gut accommodates both herbivory and carnivory. *Journal of Comparative Physiology B*. 2011; 181: 603-613.

De, D, Ghoshal, TK, Raja, RA. Characterization of enzyme-producing bacteria isolated from the gut of Asian seabass, *Lates calcarifer* and milkfish, *Chanos chanos* and their application for nutrient enrichment of feed ingredients. *Aquaculture Research*. 2012; 1-8.

Dorenbosch, M, Bakker, ES. Herbivory in omnivorous fishes: effect of plant secondary metabolites and prey stoichiometry. *Freshwater Biology*. 2011; 56: 1783-1797.

Du, Z, Tian, L, Liang, G, Lan, H, Liu, Y. The intestinal evacuation and maximum daily consumption of purified formulated diets by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *The Open Fish Science Journal*. 2009; 2: 1-5.

Duncan, SH, Louis, P, Flint, HJ. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology*. 2007; 44: 343-350.

Erfle, JD, Boila, RJ, Teather, RM, Mahadevan, S, Sauer, FD. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 1982; 65: 1457-1464.

Erwin, ES, Marco, GJ, Emery, EM. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 1961; 44: 1768-1771.

Eschbach, M, Schreiber, K, Trunk, K, Buer, J, Jahn, D, Schobert, M. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186: 4596-4604.

Fidopiastis, PM, Bezdek, DJ, Horn, MH, Kandel, JS. Characterizing the resident fermentative microbial consortium in the hindgut of the temperate-zone herbivorous fish, *Hermosilla azurea* (Teleostei: *Kyphosidae*). *Marine Biology*. 2006; 148: 631-642.

German, DP. Do herbivorous minnows have “plug-flow reactor” guts? Evidence from digestive enzyme activities, gastrointestinal fermentation, and luminal nutrient concentrations. *Journal of Comparative Physiology B*. 2009; 179: 759-771.

German, DP, Bittong, RA. Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes. *Journal of Comparative Physiology B*. 2009; 179: 1025-1042.

German, DP, Horn, MH, Gawlicka, A. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous pricklyback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2004; 77: 789-804.

German, DP, Nagle, BC, Villeda, JM, Ruiz, AM, Thomson, AW, Balderas, SC, Evans, DH. Evolution of herbivory in a carnivorous clade of minnows (Teleostei: Cyprinidae): effects on gut size and digestive physiology. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2010; 83: 1-18

Getachew, G, Crovetto, GM, Fondevila, M, Krishnamoorthy, U, Singh, B, Spanghero, M, Steingass, H, Robinson, PH, Kailas, MM. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas

production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 2002; 102: 169-180.

Goering, HK, Van Soest, PJ. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Research Handbook*. Washington. Agricultural Research Service, 1970.

Gómez, GD, Balcázar, JL. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *Immunology and Medical Microbiology*. 2008; 52: 145-154.

Han, S, Liu, Y, Zhou, Z, He, S, Cao, Y, Shi, P, Yao, B., Ringo, E. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquaculture Research*. 2010; 42: 47-56.

Hemre, G, Mommsen, TP, Krogdahl, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*. 2002; 8: 175-194.

Hickling, CF. On the feeding process in the white amur, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Zoology*. 1966; 148: 408-419.

Huber, I, Spanggaard, B, Appel, KF, 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*. 2004; 96:117-132.

Hugenholtz, F, Mullaney, JA, Kleerebezem, M, Smidt, H, Rosendale, DI. Modulation of the microbial fermentation in the gut by fermentable carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2. 2013; 133-142.

Hughes, SA, Shewry, PR, Li, L, Gibson, GR, Sanz, ML, Rastall, RA. *In vitro* fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 4589-4595.

Jiang, Y, Xie, C, Yang, G, Gong, X, Chen, X, Xu, L, Bao, B. Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. 2011; 42: 499-505.

Kihara, M, Sakata, T. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1997; 118A: 1201-107.

Kihara, M, Sakata, T. Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch culture. *Journal of Comparative Physiology B*. 2001; 171: 441-447.

Kihara, M, Sakata, T. Production of short-chain fatty acids and gas from various oligosaccharides by gut microbes of carp (*Cyprinus carpio* L.) in micro-scale batch culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002; 132 part A: 333-340.

Krogdahl, A, Hemre, GI, Mommsen, TP. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*. 2005; 11: 103-122.

Larsen, AM, Mohammed, HH, Arias, CR. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*. 2014; 116: 1396-1404.

Leenhouders, JI, Pellikaan, WF, Huizing, HFA, Coolen, ROM, Verreth, JAJ, Schrama, JW. 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*. 2008;14: 523-532.

Lésel, R, Fromageot, C, Blanc, JM, Lésel, M. Enzymatic profiles (osidases) of two cyprinids: *Ctenopharyngodon idella* and *Carassius auratus*. *Aquaculture*. 1986; 54: 19-25.

Li, H, Wu, S, Wirth, S, Hao, Y, Wang, W, Zou, H, Li, W, Wang, G. Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs. *Aquaculture Research*. 2014; 1-12.

Li, X, Yan, Q, Xie, S, Hu, W, Yuhe, Y, Hu, Z. Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Plos One*. 2013; 8:1-11.

- Liu, Y, Zhou, Z, Yao, B, Shi, P, He, S, Holvold, LB, Ringo, E. Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmon salar*) determined using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture Research*. 2008; 39: 635-646.
- McFarland, LV. Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2000; 12: 193-207.
- Macfarlane, GT, Macfarlane, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007; 18: 156-162.
- Macfarlane, S, Macfarlane, GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003; 62: 67-72.
- Majors, PD, McLean, JS, Scholten, CM. NMR bioreactor development for live *in-situ* microbial functional analysis. *Journal of Magnetic Resonance*. 2008; 192: 159-166.
- McDonald, R, Schreier, HJ, Watts, JEM. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *Plos One*. 2012; 7: 1-9.
- McDougall, EI. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 1948; 43: 99-109.
- Mechichi, T, Labat, M, Woo, THS, Thomas, P, Garcia, J-L, Patel, BKC. *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe*. 1998; 4: 283-291.
- Mondal, S, Roy, T, Ray, AK. Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2010; 41: 369-377.
- Mountfort, DO, Campbell, J, Clements, KD. Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 1374-1380.

Navarrete, P, Espejo, RT, Romero, J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbiology Ecology*. 2008; 1-12.

Nayak, SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*. 2010; 41: 1553-1573.

Ni, J, Yan, Q, Yu, Y, Zhang, T. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014; 87: 704-714.

Ni, J, Yu, Y, Zhang, T, Gao, L. Comparison of intestinal bacterial communities in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, from two different habitats. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2012; 30: 757-765.

Nichols, D, Lewis, K, Orjala, J, Mo, S, Ortenberg, R, O'Connor, P, Zhao, C, Vouros, P, Kaeberlein, T, Epstein, SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74: 4889-4897.

Olsen, GJ, Lane, DJ, Giovannoni, SJ, Pace, NR. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews of Microbiology*. 1986; 40: 337-365.

Pace, NR, Barns, SM, Reysenbach AL, Wickham, GS; Ehringer, M. Analysis of Yellowstone hot spring communities by 16S rRNA sequences without cultivation. *Beijerinck Centennial, Microbial Physiology and Gene Regulation: Emerging Principles and Applications*. Delft University Press, The Hague, Netherlands; 1995. p. 94-95.

Papanikolaou, S, Ruiz-Sanches, P, Pariset, B, Blanchard, F, Fick, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*. 2000; 77: 191-208.

Patel, JKM, Jhala, MK, Soni, P, Shabir, N, Pandya, PR, Singh, KM, Rank, DN, Joshi, CG. Molecular characterization and diversity of rumen bacterial flora in Indian goat by 16S rDNA sequencing. *VetScan*. 2011; 6:77–82.

Payne, AN, Zihler, A, Chassard, C, Lacroix, C. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*. 2012, 30: 17-25.

Pedrotti, FS, Davies, S, Merrifield, DL, Marques, MRF, Fraga, APM, Mouriño, JLP, Fracalossi, DM. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilápia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*. 2013; 1-10.

Randall, DJ, Wright, PA. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 1987; 3: 107-120.

Rawls, JF, Samuel, BS, Gordon, JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101: 4596- 4601.

Ray, AK, Ghosh, K, Ringo, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*. 2012; 18: 465-492.

Ray, AK; Roy, T, Mondal, S, Ringo, E. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquaculture Research*. 2010; 41: 1462-1469.

Reyes, A, Haynes, M, Hanson, N, Angly, FE, Health, AC, Rohwer, F, Gordon, JI. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*. 2010; 466: 334-338.

Ringo, E, Olsen, RE. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86: 22–28.

Rurangwa, E, Laranja, JL, Van Houdt, R, Delaedt, Y, Geraylou, Z, Van de Wiele, T, Van Loo, V, Van Craeyveld, V, Courtin, CM, Delcour, JA, Ollevier, F. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 106: 932-940.

Russell, JB. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 1998; 81: 3222-3230.

Russell, JB, Dombrowski, DB. Effect of pH on the efficiency of growth of pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980; 39: 604-610.

Saha, S, Roy, RN, Sen, SK, Ray, AK. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peteres) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. 2006; 37:380-388.

Sambrook, J., Russell, DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Skea, GL, Mountfort, DO, Clements, KD. Gut carbohydrases from the New Zealand marine herbivorous fishes *Kyphosus sydneyanus* (Kyphosidae), *Aplodactylus arctidens* (Aplodactylidae) and *Odax pullus* (Labridae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005; 140B: 259-269.

Smith, TB, Wahl, DH, Mackie, RI. Volatile fatty acids and anaerobic fermentation in temperate piscivorous and omnivorous freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. 1996; 48: 829-841.

Somerville, CC, Knight, IT, Straube, WL, Colwell, RR. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55: 548-554.

Song, X, Li, SF, Wang, CH, Xu, JW, Yang, QL. Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) genetic structure analyses among native populations in China and introduced populations in USA, Europe and Japan based on mitochondrial sequence. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2009; 33: 709-716.

Sullam, KE, Essinger, SD, Lozupone, CA, O'Connor, MP, Rosen, GL, Knight, R, Kilham, SS, Russell, JA. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*. 2012; 21: 3363-3378.

Terry, RA, Tilley, JMA, Outen, GE. Effect of pH on cellulose digestion under *in vitro* conditions. *Journal of Food and Agriculture*. 1969; 20: 317-320.

- Tian, LX, Liu, YJ, Hung, SSO, Deng, DF, Yang, HJ, Niu, J, Liang, GY. Effect of feeding strategy and carbohydrate source on carbohydrate utilization by grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 2010; 5(2): 135-142.
- Tindall, BJ, Rossélló-Móra, R, Busse, HJ, Ludwig, W, Kampfer, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010; 60; 249-266.
- Topping, DL, Clifton, PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiological Reviews. 2001; 81: 1031-1064.
- Trust, TJ, Bull, LM, Currie, BR, Buckley, JT. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1979; 36: 1174-1179.
- Tsuchiya, C, Sakata, T, Sugita, H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. Letters in Applied Microbiology. 2008; 46: 43-48.
- Valadares Filho, SC, Pina, DS. Fermentação ruminal. In: Berchielli, TT, Pires, AV, de Oliveira, SG. Nutrição de ruminantes. 2ª edição. Jaboticabal: Prol; 2011. 161-191.
- van Kessel, MAHJ, Dutilh, BE, Neveling, K, Kwint, MP, Veltman, JA, Flik, G, Jetten, MSM, Klaren, PHM, den Camp, HJMO. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). AMB Express. 2011; 1: 1-9.
- Walter, J, Ley, R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. Annual Review of Microbiology. 2011; 65: 411-429.
- Wang, B, Jing, L, Yue, B, Zhang, Q, Ge, W, Wang, Q, Fan, Y, Sun, P, Jiang, X, Wang, N. Digestibility of goose fed with different levels of corn straw silage. Chinese Journal of Animal Nutrition. 2008; 20: 1-7.

Wang, H, Luo, Y, Huang, H, Xu, Q. Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4 °C and its contribution to biogenic amines formation. *International Journal of Food Microbiology*. 2014a; 190: 66-71.

Wang, Q, Garrity, GM, Tiedje, JM, Cole, JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73: 5261-5267.

Wang, W, Wu, S, Zheng, Y, Cheng, Y, Li, W, Zou, H., Wang, G. Characterization of the bacterial community associated with early-developmental stages of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Research*. 2014b; 1-8.

Ward, NL, Steven, B, Penn, K, Methé, BA, Detrich III, WH. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles*. 2009; 13: 679-685.

Weatherburn, MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 1967; 39: 971-973.

Williams, BA, Bosch, MW, Boer, H, Verstegen, MWA, Tamminga, S. An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2005; 445-462.

Wilson, DB, Irwin, DC. Genetics and properties of cellulases. In: *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. New York: Springer Verlag, 1999.1-21.

Woese, CR. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 1987; 51:221-271.

Wohlgemuth, S, Keller, S, Kertscher, R, Stadion, M, Haller, D, Kisling, S, Jahreis, G, Blaut, M, Loh, G. Intestinal steroid profiles and microbiota composition in colitic mice. *Gut Microbes*. 2011; 2: 159-166.

Wu, S, Wang, G, Angert, ER, Wang, W, Li, W, Zou, H. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *Plos One*. 2012; 7: 1-11.

Young, JPW. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman e Hall; 1992. p. 43-86.

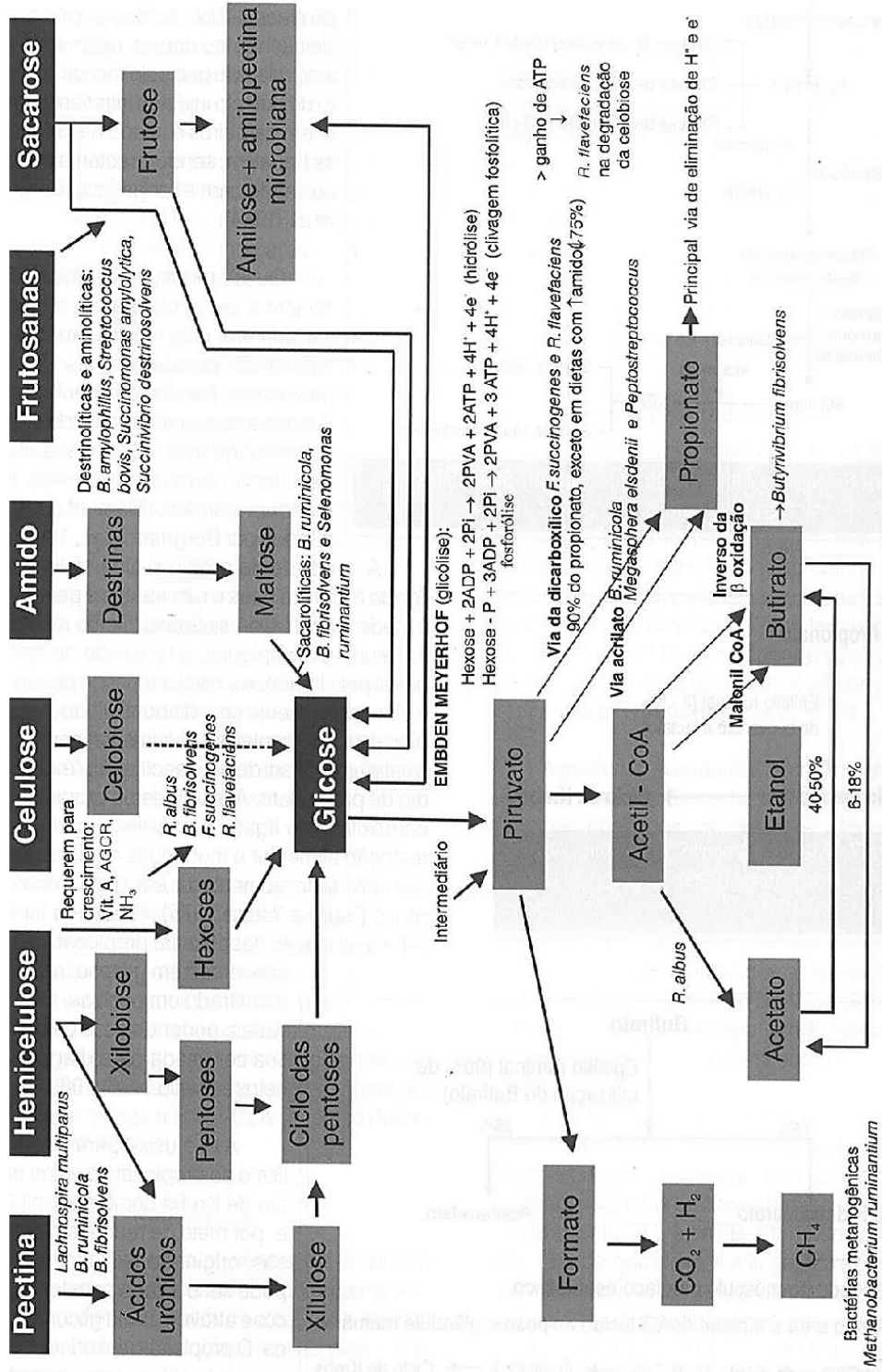
Zhou, T, Wang, Y, Tang, J, Dai, Y. Bacterial communities in Chinese grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) farming ponds. *Aquaculture Research*. 2012; 1-12.

Zhou, Y, Yuan, X, Liang, X, Li, IFJ, Guo, X, Bai, X, He, S. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulase. *Aquaculture*. 2013; 416: 1-7.

Zhu, XY, Zhong, T, Pandya, Y, Joerger, RD. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the ceccum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 124-137.

ANEXOS

1. Esquema simplificado das vias metabólicas envolvidas na fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal de ruminantes.



Fonte: Valadares Filho e Pina (2011)

2. Parâmetros ambientais das coletas de outubro de 2013 (coleta 1) e fevereiro de 2014 (coleta 2). Valor de pH do *pool* do conteúdo intestinal, mensurado nos dois experimentos realizados.

	Temp. ambiente (°C)	Temp. H ₂ O (°C)	O ₂ dissolvido na H ₂ O (mg/L)	pH H ₂ O	pH intestino
Coleta out/2013	26	24,4	6,48	6,0	7,7
Coleta fev/2014	34	28,1	3,8	7,2	7,5

3. Biometria dos espécimes de carpa capim coletadas em outubro de 2013 (1 a 4) e fevereiro de 2014 (5 a 9).

Peixe	Massa (Kg)	CT (cm)	CP (cm)	CI (cm)
1	0,45	35,5	30,0	77,5
2	0,80	40,0	33,5	86,0
3	0,45	35,0	29,5	75,0
4	0,70	40,0	34,5	88,0
5	3,16	69,0	60,0	104,0
6	1,30	50,0	42,0	114,0
7	2,30	61,0	52,0	106,0
8	4,15	72,0	62,0	125,0
9	5,00	75,0	65,0	168,0

CT: comprimento total, CP: comprimento padrão, CI: comprimento do intestino.