



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Odair José Ferreira

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA
METAGENÔMICO PARA AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE
MICROBIANA INTESTINAL EM ALEVINOSHÍBRIDOS DE
Pseudoplatystoma corruscans x *Pseudoplatystoma reticulatum***

Orientadora: Dra. Alinne Pereira de Castro

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Abril de 2017

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Padronização de Protocolo de Extração de DNA
Metagenômico para Avaliação da Comunidade Microbiana
Intestinal em Alevinos Híbridos de *Pseudoplatystoma*
corruscans x *Pseudoplatystoma reticulatum***

Autor: Odair José Ferreira
Orientadora: Dra. Alinne Pereira de Castro

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Abril de 2017

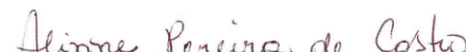
**Padronização de Protocolo de Extração de DNA Metagenômico para
Avaliação da Comunidade Microbiana Intestinal em Alevinos Híbridos de
Pseudoplatystoma corruscans x *Pseudoplatystoma reticulatum***

Autor: Odair José Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

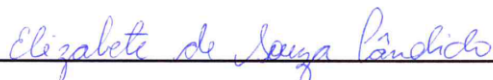
APROVADO em 03 de abril de 2017.



Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB
(orientadora)



Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB



Profa. Dra. Elisabete de Souza Cândido - UCB

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

F383p Ferreira, Odair José

Padronização de protocolo de extração de DNA metagenômico para avaliação da comunidade microbiana intestinal em alevinos híbridos de *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum* / Odair José Ferreira; orientadora Alinne Pereira de Castro -- 2017
31 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Diversidade bacteriana intestinal 2. DNA metagenômico 3. DNA - Extração 4. Peixe de água doce I. Castro, Alinne Pereira de II. Título.

CDD: 639.31

Vida Viva

(...)

Não sou ferro,
 não sou argila.
 sou Vida,
 sou energia viva.
 Não sou matéria inerte
 moldada pela situação
 ou pelo destino.
 Sou como o ar:
 quanto mais comprimido for,
 mais força manifesto,
 tal como a bomba que explode a rocha.
 Sou a VIDA que, no momento certo,
 rompe impetuosamente a situação ou o destino.
 Sou também como a água.
 Nenhuma barreira poderá represar-me
 e impedir que me torne um grande oceano.
 Se barrarem a minha passagem
 colocando grandes pedras no meu leito,
 converter-me ei em torrente, em cachoeira,
 e saltarei impetuosamente.
 Se me fecharem todas as saídas,
 eu me infiltrarei no subsolo.
 Permanecerei oculto por algum tempo,
 mas não tardarei a reaparecer.
 Em breve estarei jorrando
 através de fontes cristalinas
 para saciar a sede dos transeuntes.
 Se me impedirem também de penetrar no subsolo,
 eu me transformarei em vapor,
 formarei nuvens e cobrirei o céu.
 E, chegando a hora,
 atrairei furacão,
 provocarei relâmpagos e trovões,
 desabarei torrencialmente,
 inundarei e romperei quaisquer diques
 e serei finalmente um grande oceano.

Masaharu Taniguchi (1893-1985)

Dedico aos meus antepassados, pais, irmãos, sobrinhos, filha, genro, netos, tios e primos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais e antepassados por permitirem a minha vinda a este mundo, nesse sentido, eles representam Deus a grande Vida do Universo.

À minha filha Taís que é a minha fonte inspiradora para seguir o caminho da honradez. Principalmente por ela dar continuidade à linhagem me presenteando com uma neta Alice e o Arthur que em breve estará deixando o seu ventre.

Ao meu genro Igor, que apesar de ser ainda muito jovem, assumiu compromisso perante a minha filha.

Aos meus irmãos Júnio, Noeli e Célio, pelo cuidado que eles têm pelos meus pais, uma vez que estou distante e não posso vê-los diariamente, ou pelo menos semanalmente.

Aos meus sobrinhos pelos momentos agradáveis que passamos ao longo desses anos...

À minha vó Ana, que já está com idade avançada, mas não deixa de se preocupar com suas filhas, genros e netos.

Ao governo do Estado de Rondônia, na pessoa do Governador e da Secretária da Educação, respectivamente Confúcio Aires Moura e Aparecida de Fátima Gavioli Soares Pereira, os quais concederam licença integral para frequentar o curso Strictu Sensu, Mestrado em Biotecnologia da UCDB.

Agradeço a UCDB, na pessoa do Dr. Cristiano, coordenador do Mestrado e Doutorado em Biotecnologia, por proporcionar a aquisição de tão valioso conhecimento.

À FUNDECT e CAPES pelo auxílio financeiro prestado através da concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus tios Antônio e Maria de Lourdes, e aos meus primos Sueli, Marcos, Max William e Débora por me receber para o almoço nos finais de semana.

Ao Mestre Masaharu Taniguchi (1893-1985), fundador da entidade religiosa Seicho-No-Ie (Lar do Progredir Infinito), muito obrigado por ter deixado um legado

espiritual em forma de livros, livros esses que me ensinaram a amar e agradecer. Nesse sentido, agradeço aos meus irmãos de fé da Seicho-No-Ie, Regional MS-Campo Grande, os quais me proporcionaram o suporte espiritual.

Agradeço também a todos os meus amigos, desde aqueles de longa data (Ivinhema-MS), como também os amigos recentes que conheci no mestrado (Campo Grande-MS).

A todos os professores credenciados ao Programa de Pós-graduação do Mestrado em Biotecnologia da UCDB, pela transmissão de conhecimento, experiência de vida e convivência harmoniosa.

Não poderia de deixar de agradecer a Silvia secretária do mestrado em biotecnologia pela assistência, esclarecimento e companheirismo, bem como, a Daiane secretária do Mestrado em Ciências Ambientais. Muito obrigado pelo café.

Agradeço também a todos os meus tios e primos paternos e maternos, uns presentes outros ausentes, mas afinal somos da mesma família.

À Roseli Poiane, secretária da Coordenadoria Regional de Educação de São Francisco do Guaporé-RO, pelo cuidado dispensado e pelo profissionalismo.

Agradeço a ex-coordenadora de educação de São Francisco do Guaporé, Maria Roos de Castro e ao atual coordenador de educação José Maurício de Carvalho, por aprovar a primeira etapa do processo de licença para frequentar o mestrado em biotecnologia.

Aos meus ex-alunos e amigos professores e demais profissionais da educação da Secretaria de Educação do Estado de Rondônia SEDUC/RO. Desculpe por não poder citar nomes.

Agradeço especialmente a família Machado de São Francisco do Guaporé-RO, amigos para todos os momentos. Minha eterna gratidão.

Agradeço também a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu aprendizado.

Não posso esquecer-me do Microbiome Group, principalmente pelas comemorações das vitórias alcançadas por seus integrantes. “Pizza paçoca c/ Nutella”, esse era o nosso grupo no WhatsApp. Saudades...

Finalmente, agradeço a minha orientadora Dra. Alinne Castro, por ter aceitado o convite para me orientar, desde a especialização à distância. Minha eterna gratidão.

Biografia do Autor

O autor Odair José Ferreira tem como genitores José Mendes Ferreira e Nair Palomo Grande Ferreira. Nasceu no dia 01 de outubro de 1972 na cidade de Ivinhema – MS. Graduiu-se em Ciências Hab/Biologia pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), possui especialização (Lato Sensu) em biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). É funcionário do quadro efetivo (professor de biologia) da Secretaria de Estado da Educação do Estado de Rondônia SEDUC/RO, lotado na Coordenadoria de Regional de Educação de São Francisco do Guaporé - RO, na função de Coordenador Regional do Programa Saúde na Escola – PSE. Possui cinco anos experiência como docente de Biologia para o Ensino Médio.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Panorama geral da aquicultura no Brasil e a produção do pintado, do cachara e do híbrido entre essas duas espécies.....	3
2.2 Características gerais das espécies <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> e <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	6
2.3 Piscicultura do pintado, cachara e do híbrido entre essas duas espécies	7
2.4 O intestino do <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	8
2.5 Importância da comunidade bacteriana para o peixe.....	9
2.5.1 Microbiota	9
2.5.2 Comunidade bacteriana associada ao intestino de peixes	10
2.6 Técnicas moleculares	11
2.6.1 Extração direta de DNA metagenômico microbiano	11
2.6.2 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do gene 16S rDNA	12
3 JUSTIFICATIVA.....	13
4 OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo geral	14
4.2 Objetivos específicos	14
5 MATERIAL E METODOS	15
5.1 Coleta das amostras	15
5.2 Eutanásia	16
5.3 Extração direta de DNA metagenômico microbiano.....	17
5.4 Amplificação do gene 16S rDNA.....	19
6 RESULTADOS.....	20
6.1 Extração direta de DNA metagenômico microbiano.....	20

6.2 Amplificação do gene 16S rDNA.....	21
7 DISCUSSÃO	22
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
9 REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tanques para piscicultura.	4
Figura 2. Surubins: cachara <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> e pintado <i>P. corruscans</i> do Rio Paraná.	6
Figura 3. Alevinos híbridos de <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	8
Figura 4. Anatomia do intestino de alevino híbrido <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	9
Figura 5. Amostra de alevino de <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	15
Figura 6. Remoção de intestino de alevino híbrido de <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	16
Figura 7. Gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo (2 µg/mL), contendo amostras de DNA metagenômico bacteriano oriundas do intestino médio de alevinos híbridos <i>P. corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	20
Figura 8. gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (2 µg/mL), contendo produtos da PCR do gene 16S rDNA bacteriano oriundas do intestino médio de alevinos híbridos <i>P. corruscans</i> x <i>P. reticulatum</i>	21

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. <i>Protocol of the Repeated Bead Beating Plus Column (RBB+C) Method....</i>	17
Tabela 2. Concentração de DNA obtido na extração mediante protocolo padronizado	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CTAB:** *Cetyl trimethylammonium bromide* – Brometo de cetiltrimetilamônio
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP's:** Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic acid* – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FUNDECT:** Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
- g:** Grama
- µg:** Micrograma
- mg:** Miligrama
- µL:** Microlitro
- mL:** Mililitro
- M:** Molar
- mM:** Milimolar
- MgCl:** Cloreto de magnésio
- NaCl:** Cloreto de sódio
- ng:** Nanograma
- OTU:** *Operational Taxonomic Unit* – Unidade taxonômica operacional
- Pb:** Pares de bases
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase
- PPS:** *Protein Precipitation Solution* – Solução de Precipitação Proteica
- RBB+C:** *Protocol of the Repeated Bead Beating Plus Column Method*
- rDNA:** *Ribosomal deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico ribossômico
- RNA:** *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucléico
- Rpm:** Rotações por minuto
- SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate* – Dodecil Sulfato de Sódio
- 16SrDNA:** Menor subunidade do gene 16S do DNA ribossômico
- TBE:** Tris/Borato/EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris-HCL: Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano

UCDB: Universidade Católica Dom Bosco

X: Usado na nomenclatura zoologia para indicar o cruzamento artificial entre diferentes espécies

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius

%: Porcentagem

RESUMO

Os surubins do gênero *Pseudoplatystoma* são peixes migratórios de grande porte, elevado valor comercial e amplamente distribuído pela América do Sul. No Brasil, os surubins *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *P. reticulatum* (cachara), são muito apreciados pela qualidade de sua carne e também para pesca esportiva, sendo esses fatores responsáveis pela diminuição dos estoques naturais desses surubins. No entanto, para suprir o mercado consumidor e esportivo, híbridos dessas duas espécies, são amplamente cultivados pela piscicultura brasileira. Mas, durante o processo de criação dos alevinos híbridos, os piscicultores encontram alguns entraves, incluindo infecções bacterianas. Por outro lado, a comunidade bacteriana intestinal em peixes apresenta várias funções no hospedeiro, incluindo resistência a doenças e imunidade. Nesse sentido, a caracterização da comunidade microbiana intestinal em alevinos híbridos poderá fornecer uma compreensão taxonômica e funcional dessa comunidade. Para uma análise efetiva da diversidade microbiana, uma das etapas mais importantes é o isolamento de DNA metagenômico. Portanto, a utilização de um protocolo de extração de DNA eficaz no quesito de rendimento e pureza faz-se necessário. Nesse contexto, o presente estudo objetivou a padronização de protocolo para extração de DNA metagenômico da comunidade microbiana associada ao intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*. Diante do exposto, foram utilizadas três réplicas biológicas para extração de DNA metagenômico, as quais obtiveram 78 ng/μL, 106 ng/μL e 67,8 ng/μL respectivamente. A reação em cadeia da polimerase das amostras comprovou a presença do gene 16S rDNA, assim evidenciando a presença de DNA metagenômico bacteriano obtida a partir do protocolo otimizado. Os resultados obtidos demonstraram que o protocolo padronizado foi eficaz na extração de DNA metagenômico da comunidade microbiana associada ao intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana intestinal, DNA metagenômico, protocolo de extração de DNA.

ABSTRACT

The surubins of the genus *Pseudoplatystoma* are migratory fishes with high commercial value and widely distributed throughout South America. In Brazil, the *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) and *P. reticulatum* (cachara) are appreciated for the quality of their meat and also for sport fishing, being these factors responsible for the decrease of the natural stocks of these surubins. However, to supply the consumer and sports market, hybrids of these two species, are widely cultivated by Brazilian fish farming. But during the process of creating the hybrid fry, fish farmers encounter some barriers, including bacterial infections. On the other hand, the intestinal microbial community in fish exhibits various functions in the host, including disease resistance and immunity. In this context, the characterization of the intestinal bacterial community in hybrid fingerlings may provide a taxonomical and functional understanding of this community. For an effective analysis of microbial diversity one of the most important steps is the isolation of metagenomic DNA. Therefore, the use of an efficient DNA extraction protocol in terms of yield and purity is necessary. In this context, the present study aimed at the standardization of protocol for extraction of metagenomic DNA from the gut associated with the midgut of hybrid fingerlings *P. corruscans* x *P. reticulatum*. Three biological replicates were used to extract microbial metagenomic DNA, which obtained 78 ng/μL, 106 ng/μL and 67,8 ng/μL, respectively. The polymerase chain reaction of the samples confirmed the presence of the 16S rDNA gene, thus evidencing the presence of bacterial metagenomic DNA obtained from the optimized protocol. The results obtained demonstrated that the standardized protocol was effective in the extraction of metagenomic DNA from the microbial community associated to the midgut of hybrid fingerlings *P. corruscans* x *P. reticulatum*.

Key words: Intestinal bacterial diversity, metagenomic DNA, DNA extraction protocol.

1 INTRODUÇÃO

Em 2014 a aquicultura mundial produziu 73,8 milhões de toneladas de pescado utilizado para alimentação humana, equivalente a US\$160,2 bilhões. Desse montante, 49,8 milhões de toneladas (US\$ 99,2 bilhões) são de peixes oriundos da aquicultura continental e marinha (FAO, 2016). Nesse período, a aquicultura brasileira produziu 561,8 mil toneladas de pescado, ou seja, 0,7% da produção global de pescado, atribuindo 474,3 mil toneladas à produção de peixes de cativeiros, ou seja, 0,6% da produção mundial de peixes (FAO, 2016).

Na aquicultura brasileira, os surubins gênero *Pseudoplatystoma*, são um dos mais nobres peixes de água doce e de maior valor comercial (INOUE et al., 2009). Dentre os surubins, o pintado *Pseudoplatystoma corruscans* e o cachara *P. reticulatum* são uma das principais espécies brasileiras, com alta importância biológica e elevado valor comercial na América do Sul (BIGNOTTO et al., 2009). Entretanto, híbridos envolvendo as espécies *P. corruscans* x *P. reticulatum* são amplamente comercializados por apresentarem maior docilidade e precocidade quando comparados aos parentais (VAINI et al., 2014). Por outro lado, são escassos os conhecimentos a respeito da biologia das fases iniciais das espécies puras, e para os híbridos, praticamente inexistentes (ISHIKAWA et al., 2012).

Nesse sentido, compilações de estudos em peixe de água doce e marinha têm demonstrado o dinamismo e a complexidade da microbiota intestinal, que consiste em bactérias, leveduras, vírus, archaeas e protozoários, com destaque para o domínio das bactérias sobre os demais grupos da microbiota intestinal (NAIAK, 2010 a; ROMERO et al., 2014). Estas compilações ainda enfatizam que as bactérias exercem influências em várias funções do hospedeiro, incluindo desenvolvimento, digestão, nutrição, resistência a doenças e imunidade (NAIAK, 2010a; ROMERO et al., 2014).

Neste contexto, técnicas moleculares são frequentemente utilizadas na identificação da comunidade microbiana. Portanto a extração de DNA é um passo essencial em todas as abordagens independentes do cultivo para caracterizar a

diversidade dessa comunidade (YUAN et al., 2012). Nesse sentido, a metagenômica (abordagem independente de cultivo) permite a análise da comunidade microbiana presente em uma amostra ambiental, através do isolamento do DNA e identificação de genes (VIEITES et al., 2010). No entanto, um desafio fundamental no uso dessas abordagens tem sido o isolamento do DNA representativo da comunidade microbiana amostrada (YUAN et al., 2012). Uma vez, que nos métodos frequentemente utilizados, são encontrados problemas em termos de rendimentos de DNA relativamente baixos e/ou recuperação de DNA isento de substâncias inibitórias (YU e MORRISON, 2004).

Nesse sentido, a quantidade e pureza do DNA representativo da comunidade bacteriana ou DNA metagenômico é fundamental para todas as etapas da identificação dessa comunidade. Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo a padronização de protocolo de extração de DNA metagenômico bacteriano associado ao intestino médio de alevinos híbridos das espécies *P. corruscans* x *P. reticulatum*. O qual servirá de subsídio para posterior caracterização da comunidade bacteriana associada ao intestino médio dessa linhagem híbrida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama geral da aquicultura no Brasil e a produção do pintado, do cachara e do híbrido entre essas duas espécies

Em 2014, a produção de pescado brasileiro oriundo da aquicultura foi de 561,8 mil toneladas equivalentes a US\$ 1,45 bilhões (IBGE, 2014), representando um aumento de 17,2% em relação à produção de 2010, que foi de 479,3 mil toneladas (BRASIL, 2012). Desse montante de 561,8 mil toneladas de pescado brasileiro oriundo da aquicultura, 474,3 mil toneladas (84,4%) são advindas da produção de peixes da piscicultura continental (FAO, 2016). Assim, em 2014 a aquicultura brasileira participou com 0,7% da produção global de pescado e com 0,9% da produção mundial de peixes (FAO, 2016).

Na produção brasileira por espécie em 2010, o pintado *P. corruscans* representou um quantitativo de 2,4 mil toneladas, ou 0,6% da produção brasileira de peixes que foi de 394,3 mil toneladas. A produção do cachara foi incluída nos bagres, com uma produção de 4 mil toneladas, não sendo possível precisar a produção exata do *P. reticulatum* (BRASIL, 2012). Já em 2014, do montante de 474,3 mil toneladas de peixes produzidas pela piscicultura continental brasileira, 20,4 mil toneladas ou 4,3% dessa produção, foi atribuída aos surubins *P. corruscans*, *P. reticulatum* e dos híbridos dessas duas espécies (IBGE, 2014).

A análise dos dados citados demonstra que no período 2010-2014, o Brasil obteve um aumento de 17, 2% em sua produção de pescado, participando em 2014 com 0,7% da produção global de pescado, e com 0,9% da produção mundial de peixes em sua piscicultura continental. Por outro lado, em 2010 o pintado *P. corruscans*, obteve uma produção de 2,4 mil toneladas, ou (0,6%) da produção brasileira de peixes que foi de 394,3 mil toneladas. Entretanto, em 2014 a produção do *P. corruscans* foi associada ao cachara e aos híbridos dessas duas espécies,

bem como, aos demais surubins, totalizando 20,4 mil toneladas, ou 4,3% da produção desse período.

Os fatores que contribuem para o crescimento da piscicultura no Brasil são: grande potencial hídrico, com 13,7% da água doce disponível no planeta (SUPLICY, 2007); clima quente o ano todo na maior parte do país (ROTTA, 2003); grande variedade de peixes em suas bacias hidrográficas com potencial para cultivo (ROTTA, 2003; SUPLICY, 2007) e a disponibilidade de um número significativo de informações sobre enfermidades de peixes na fase jovem ou adulta, tanto de animais da natureza como de cultivo (TAVARES-DIAS et al., 2013). Esses são os fatores que refletem no grande número de espécies de peixes sendo cultivadas no país (SUPLICY, 2007).

Diante do exposto, o nível de procura pela criação de peixes em cativeiro (Figura 1) têm sido crescente, principalmente pelas espécies nativas tropicais (FERNANDES, et al., 2000), com destaque para os surubins, dentre eles, o pintado *P. corruscans* e o cachara *P. reticulatum* (CREPALDI et al., 2006) e para os híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum* (VAINI et al., 2014).



Figura 1. Tanques para piscicultura.

Fonte: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI255147-18289,00-TANQUES+PARA+PISCICULTURA.html>>.

Entretanto, na fase de alevinagem, o sistema imunológico dos peixes ainda não responde aos estímulos ambientais em que são submetidos devido ao manejo, transporte, alimentação, qualidade da água, parasitos etc., sendo susceptíveis ao estresse e doenças (TAVARES-DIAS et al., 2013). Assim, os aspectos sanitários na

fase de alevinagem são um dos maiores entraves para o aumento da produtividade dos plantéis, com destaque para as bactérias patogênicas, dentre elas a *Flavobacterium columnare* (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Evidenciando que os primeiros estágios são os mais sensíveis na vida dos peixes (NASCIMENTO et al., 2007).

Neste contexto, alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, produzidos pela empresa Projeto Pacu Aquicultura Ltda (<http://www.projetopacu.com.br/>), localizado no município de Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil, apresentam no verão, taxa de mortalidade de 15% a 45%, ocasionadas principalmente por bactérias, com destaque para *F. columnare* (Dados fornecidos pelos responsáveis da empresa).

As doenças bacterianas são responsáveis por importantes perdas econômicas na aquicultura no mundo todo (PÁDUA et al., 2014). Pois são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade de peixes e, quando não ocasionam mortalidade, provocam lesões que inviabilizam sua comercialização, causando grandes prejuízos econômicos (PILARSKI et al., 2011).

A columnariose é uma doença bacteriana que tem como agente etiológico *F. columnare*, que afetam gravemente as brânquias de numerosas espécies de peixes de água doce em todo o mundo (DECOSTERE, 2002), principalmente na fase de alevino (PILARSKI et al, 2011). Essas bactérias afetam tanto peixes cultivados como selvagens, incluindo muitas espécies de peixes comercialmente importantes, com um alto grau de mortalidade, levando a graves perdas econômicas (DECLERCQ et al., 2013).

No Brasil a *F. columnare* é frequentemente encontrada nas pisciculturas, causando mortalidade massiva em alevinos e peixes jovens (INOUE et al., 2009). Esse agente causa uma doença ulcerativa não hemorrágica nos alevinos, com corrosão das nadadeiras, pele e necrose branquial. Surtos dessa bactéria são comuns após o manejo de classificação dos alevinos, em razão da perda do muco protetor, associada ao estresse de manejo (ISHIKAWA et al., 2012).

2.2 Características gerais das espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*

Os surubins, pintado *P. corruscans* e o cachara *P. reticulatum* (Figura 2) (ISHIKAWA et al., 2012), são peixes migratório de grande porte com alta importância biológica (BIGNOTTO et al., 2009) e amplamente distribuído na América do Sul (BUITRAGO–SUÁREZ e BURR, 2007). Essas duas espécies são estritamente piscívoras com hábitos noturnos, não apresentam escamas, sendo revestido por pele espessa (CREPALDI et al., 2006).

P. corruscans povoa as bacias dos Rios São Francisco, Paraná, Paraguai e Prata (BUITRAGO–SUÁREZ e BURR, 2007). Apresenta barbilhões médios e cavidade bucofaringiana com adaptações anatômicas ao hábito alimentar onívoro, sendo preferencialmente carnívoro, ictiófago (RODRIGUES e MENIN, 2006). Uma característica marcante do pintado é a presença de manchas negras arredondadas ou ovaladas, às vezes confluentes entre si, distribuídas pelo corpo (BRITSKI et al., 1999).



Figura 2. Surubins: cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* (acima) e pintado *P. corruscans* (abaixo) do Rio Paraná. Foto: Mark. H. Sabaj. Fonte: (BUITRAGO–SUÁREZ e BURR, 2007).

P. reticulatum ocorre da Amazônia Central até o Uruguai, povoando as bacias dos Rios Paraguai, Paraná e Prata. Diferentemente do pintado, o cachara não ocorre no Rio São Francisco (BUIRAGO–SUÁREZ e BURR, 2007). O cachara apresenta três pares de barbilhões, e manchas negras verticais que se encontram no dorso.

2.3 Piscicultura do pintado, cachara e do híbrido entre essas duas espécies

Peixes do gênero *Pseudoplatystoma* são conhecidos por sua elevada taxa de crescimento e bom rendimento de carcaça, assim como por sua carne de sabor delicado e sem espinhos (LABARRÈRE et al., 2012).

A diminuição dos estoques naturais dos surubins, dentre eles, o pintado *P. corruscans* e o cachara *P. reticulatum* vem impulsionando sua produção em cativeiro. Apesar de não se ter um pacote tecnológico completo para a produção, o seu grande potencial produtivo e a qualidade da sua carne despertam grande interesse comercial (CREPALDI et al., 2006).

Quanto à alimentação, na natureza os surubins (*Pseudoplatystoma*) se alimentam especialmente de outros peixes, e devido aos hábitos noturnos, alimentam-se melhor nos horários de baixa luminosidade (ao amanhecer, ao anoitecer e durante toda a noite). No entanto, na produção em cativeiros, o uso de rações comerciais secas é indispensável para viabilizar a produção dos surubins para o consumo, pesca recreativa ou comercialização. Mas, os surubins (*Pseudoplatystoma*) só aceitam rações secas após o condicionamento ou treino alimentar feito durante o período de alevinagem. Nesse sentido, os alevinos passam por um condicionamento alimentar ao longo do cultivo, tornando-se facilmente habituados à alimentação durante o dia em horários de plena luz (Projeto Pacu Aquicultura Ltda, <http://www.projetopacu.com.br/arquivos/>)

Entretanto, híbridos envolvendo as espécies *P. corruscans* x *P. reticulatum* são amplamente comercializados por apresentarem maior docilidade e precocidade quando comparados aos parentais (VAIANI et al., 2014). Outra linhagem comercializada no Brasil trata-se do híbrido entre o pintado *P. corruscans* e o cachara amazônico *P. fasciatum* (CREPALDI et al., 2006). Em estudo comparativo realizado com alevinos híbridos (*P. corruscans* x *P. fasciatum*) e *P. corruscans* do

Rio São Francisco, os alevinos híbridos apresentaram ganho de peso superior aos alevinos *P. corruscans* puros (CREPALDI et al., 2006).

No estado do Mato Grosso do sul, Brasil, produtores de alevinos híbridos do cachara pantaneiro *P. reticulatum* com o pintado *P. corruscans*, denominado popularmente como ponto e vírgula (Figura 3), também afirmam que os peixes híbridos parecem ser mais dóceis e apresentam melhor desempenho produtivo que as espécies puras, portanto, mais economicamente viáveis que as espécies puras (ISHIKAWA et al., 2012).

Nesse sentido, em estudo realizado na Estação de Piscicultura Projeto Pacu, em Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil, demonstrou que o crescimento de alevinos de pintado híbridos e puros depende do crescimento intestinal. Os peixes híbridos apresentaram maior velocidade de crescimento intestinal, o que lhes permite obter melhor desempenho ao final do condicionamento alimentar (BARBOSA et al., 2011).



Figura 3. Alevinos híbridos de *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*. (Imagem obtida de um dos tanques da empresa Projeto Pacu Aquicultura Ltda.)

2.4 O intestino do *Pseudoplatystoma corruscans*

Nos peixes, o intestino é um tubo relativamente simples, iniciando na válvula pilórica e terminando no reto. Possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos de sangue e de linfa, onde se completa a digestão iniciada no estômago. No intestino é onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons

e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução o que facilita a absorção (ROTTA, 2003).

O intestino do *P. corruscans* apresenta parede pouco espessa quando comparado com a do estômago, sendo composto por três regiões: intestino proximal, intestino médio e intestino distal ou reto (Figura 4). O intestino proximal inicia-se na junção entre o estômago e o intestino, compreende uma curvatura em torno do estômago e apresenta duas constrições. O intestino médio inicia-se no ponto em que o intestino proximal sofre a terceira constrição e diminuição do diâmetro. O intestino médio apresenta enovelamento e diâmetro mais delgado que o intestino proximal (CAL, 2006). O intestino distal ou reto trata-se de uma região retilínea que desemboca no ânus (CAL, 2006). Inicia-se na valva ileorretal que separa o intestino médio do reto (SEIXAS-FILHO et al., 2001). O reto pode ser diferenciado do intestino médio, pelo decréscimo da vascularização e do número de células secretoras e pelo aumento do número de células produtoras de muco, as quais podem ser visualizadas histologicamente (ROTTA, 2003).

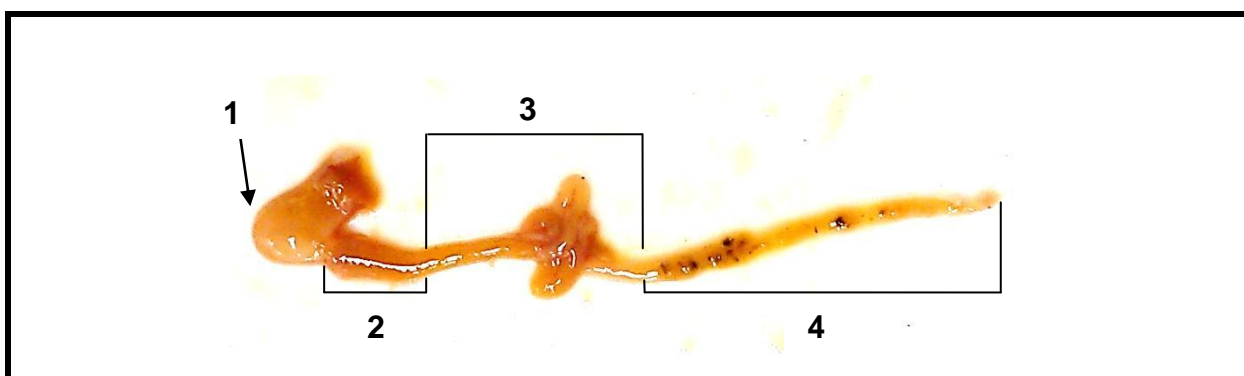


Figura 4. Anatomia do intestino de alevino híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum* baseada em intestino de *P. corruscans*, segundo Cal, 2006. 1 Estômago, 2 Intestino proximal, 3 Intestino médio e 4 Intestino distal ou reto. Fonte da imagem: arquivo próprio.

2.5 Importância da comunidade bacteriana para o peixe

2.5.1 Microbiota

Microbiota refere-se à comunidade de micro-organismos que ocupa um ambiente específico (MARCHESI e RAVEL, 2015). A composição desta comunidade microbiana é específica para cada hospedeiro, evoluindo ao longo da

vida de um indivíduo e suscetível a ambas as modificações exógenas e endógenas (SEKIROV et al., 2010). Entre os grupos de micro-organismos, as bactérias são os principais colonizadores que constituem a microbiota intestinal de peixe, tanto de água doce, quanto marinho (NAIAK, 2010 a), e isso também se aplica às brânquias (WANG et al., 2010) e à pele (WANG et al., 2010; LOKESH e KIRON, 2016).

2.5.2 Comunidade bacteriana associada ao intestino de peixes

As bactérias são dominantes sobre os demais grupos da microbiota intestinal e exercem influências em várias funções do hospedeiro, incluindo desenvolvimento, digestão, nutrição, resistência a doenças e imunidade (NAIAK, 2010a; ROMERO et al., 2014). Corroborando, outros estudos demonstram o domínio das bactérias sobre os demais componentes da microbiota intestinal (LARSEN et al., 2014; XIA et al., 2014; LOWREY et al., 2015), a qual pode variar de espécie para espécie, assim como em relação às condições ambientais (ROMERO et al., 2014).

Assim, devido à forte influência da microbiota intestinal na saúde dos peixes, espécies de bactérias dominantes no intestino são fortes candidatos para os probióticos (LARSEN et al., 2014). Os probióticos são micro-organismos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro, devido o seu envolvimento na nutrição, resistência a doenças e outras atividades benéficas no peixe (NAYAK, 2010 b).

Nesse sentido, o conhecimento da composição taxonômica dessas comunidades bacterianas poderá indicar o seu papel na saúde e na doença, permitindo a personalização de modalidades terapêuticas e profiláticas existentes e futuras (SEKIROV et al., 2010).

Por outro lado, as condições ambientais podem alterar a composição da comunidade bacteriana intestinal presente nesses indivíduos. Isso ficou evidente em grupo de robalos asiáticos (*Lates calcarifer*) cultivados em água doce no *Temasek Life Sciences Laboratory*, Singapura, e submetidos à fome, cujas comunidades bacterianas diferiram significativamente do grupo de controle (XIA et al., 2014). No grupo de controle de *Lates calcarifer* foram descritos os domínios dos seguintes filos de bactérias: Proteobactérias 48,8%; Firmicutes 15,3%; Bacteroides 8,2% e Fusobactérias 7,3%, sobre sua microbiota intestinal. Já no grupo submetido à fome

temos: Proteobactérias 39,1%; Bacteroides 36,0% e Firmicutes 10,1% (XIA et al., 2014).

Estes resultados demonstram que sob *stress* ocorre alteração da comunidade bacteriana intestinal. Nesse ponto, as comunidades bacterianas que servirão de base para a elaboração de modalidades terapêuticas e profiláticas, deverão ser obtidas em condições ambientais adequadas e livres de patógenos, principalmente bacterianos.

2.6 Técnicas moleculares

2.6.1 Extração direta de DNA metagenômico microbiano

O termo metagenômica se refere a uma abordagem independente de cultivo baseada na investigação das moléculas de DNA de um conjunto de populações microbianas e é baseado na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN et al., 1998). Sendo assim, se caracteriza por contornar a necessidade de cultivo, em função da vasta diversidade microbiana, ser conduzida em grande escala (HANDELSMAN, 2004). A abordagem metagenômica é conduzida de forma que o DNA metagenômico seja analisado através da investigação funcional e/ou baseada em sequenciamento de DNA, e para isso, primeiramente o DNA metagenômico microbiano é extraído da amostra, em seguida ocorre a amplificação e o sequenciamento do gene 16S rDNA.

A extração do DNA metagenômico microbiano poderá ser realizada mediante *Kits* comerciais, bem como, através de protocolos padronizados. Nesse sentido, os protocolos padronizados poderão facilitar o processo de extração de DNA metagenômico, bem como obter maior rendimento, qualidade e pureza da amostra. Quanto a eficiência da extração em relação à pureza e o isolamento do DNA representativo da comunidade bacteriana amostrada, os protocolos padronizados poderão ser avaliados mediante quantificação, eletroforese em gel de agarose, amplificação do gene 16S rDNA e posterior caracterização da comunidade bacteriana.

2.6.2 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do gene 16S rDNA

Fragmentos do gene 16S rDNA extraídos do DNA metagenômico e amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido frequentemente aplicado à recolha de impressões digitais das populações bacterianas naturais (WATANABE et al., 2001). Isso se deve ao fato, que através da utilização deste método, o estudo filogenético de espécies bacterianas altamente patogênicas pode ser realizado sem a necessidade de cultivá-los (WEISBURG, et al., 1991). O que também se aplica no caso de bactérias com perfis fenotípicos incomuns, bactérias raras, bactérias de crescimento lento e bactérias incultiváveis. Essas evidências demonstram que o gene 16S rDNA é particularmente importante na identificação de bactérias (WOO et al., 2008).

Assim, após a PCR ocorre o sequenciamento do gene 16S rDNA. Em seguida as sequências são analisadas em programas de bioinformática identificando a unidade taxonômica operacional (OTU) e permitindo o estabelecimento de perfis de riqueza, composição e estrutura da comunidade bacteriana (FRANZÉN et al., 2015).

Neste contexto, o uso de sequências do gene 16S rDNA se deve ao fato desse gene estar presente em todas as bactérias, e conter regiões altamente conservadas, ou seja, a sua função não mudou ao longo do tempo, sendo utilizada na identificação de características filogenéticas e taxonômicas de comunidades bacterianas (JANDA e ABBOTT, 2007).

Enfatizamos ainda que o gene 16S rDNA contém aproximadamente 1500 pares de bases (JANDA e ABBOTT, 2007) e nove "regiões hipervariáveis" (V1 - V9) que demonstram uma diversidade considerável de sequência entre diferentes bactérias (CHAKRAVORTY et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

A comunidade bacteriana intestinal influencia em várias funções do hospedeiro, incluindo desenvolvimento, digestão, nutrição, resistência a doenças e imunidade. Nesse contexto, devido à influência da microbiota intestinal na saúde dos peixes, recentes estudos demonstraram que espécies de bactérias dominantes no intestino são fortes candidatos a probióticos.

Nesse sentido, a padronização de protocolo para extração de DNA metagenômico para avaliação da microbiota associada ao intestino médio de alevinos híbridos de *P. corruscans* x *P. reticulatum*, consolidará informações que permitirão a extração de DNA metagenômico. Consequentemente, a partir do DNA metagenômico obtido mediante o protocolo padronizado, será possível fornecer elementos para amplificação do gene 16S rDNA e posterior caracterização da comunidade bacteriana em questão.

Assim, salientamos que o conhecimento da composição da comunidade bacteriana poderá indicar o seu papel na saúde e na doença, o que permitirá a elaboração de modalidades terapêuticas e profiláticas (probióticos), bem como, fornecer dados para a implantação de políticas públicas relacionadas à sanidade da espécie em questão. Podendo ainda contribuir com o aumento da produção de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, bem como, o aumento da participação dessa espécie na piscicultura brasileira.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Padronizar protocolo de extração de DNA metagenômico para avaliação da comunidade microbiana associada ao intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*.

4.2 Objetivos específicos

- I. Extrair DNA metagenômico das amostras do intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*;
- II. Amplificar o gene 16S rDNA das amostras do intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*.

5 MATERIAL E METODOS

5.1 Coleta das amostras

As amostras de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum* foram fornecidas pela empresa Projeto Pacu Aquicultura Ltda. No total a empresa forneceu 10 amostras com 37 dias de idade. Seleccionamos três réplicas biológicas, as quais apresentaram, respectivamente: massa corpórea 10,94 g, 11,40 e 11,95 g, com média de 11,43 g e desvio padrão 0,412; comprimento 12,3 cm, 12,5 cm e 12,8 cm, com média de 12,53 cm e desvio padrão de 0,205. Ver representante das amostras (Figura 5).

De acordo com a rotina da Piscicultura Projeto Pacu Ltda, os alevinos fornecidos, foram cultivados na fase larval que dura em torno de 10 dias, em tanques de terra a céu aberto do tipo *raceway*, com dieta planctônica. Após a fase larval, os alevinos foram deslocados para galpões cobertos. Nessa fase, ou fase de alevino, iniciou-se o condicionamento alimentar com ração balanceada comercial seca extrusada destinada para peixes ictiófagos, com 40% de proteína bruta. No entanto, nos dez primeiros dias do condicionamento alimentar, os alevinos foram alimentados com ração extrusada associada a 20 mg *florfenicol* 50%, distribuída em seis refeições diárias. Após esse período de dez dias do condicionamento alimentar, até atingirem a idade de 37 dias, os alevinos receberam apenas a ração comercial extrusada com 40% de proteína bruta.



Figura 5. Amostra de alevino de *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*. O alevino apresentou 11,32 g de massa corpórea e 12,5 cm de comprimento.

Por sua vez, as amostras foram recepcionadas no Laboratório de Microbiologia – *S-Inova Biotech* da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Em seguida os intestinos dos alevinos (Figura 6) foram extraídos assepticamente com o auxílio de bisturis, cabos para bisturis, pinças, placas de petri e acondicionados individualmente em tubos de 2,0 mL contendo tampão de conservação [100 mM de Tris-HCL, 100 mM de EDTA, 20 mM de NaCl] e conservados no freezer a -20°C.



Figura 6. Intestino de alevino híbrido de *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*.

5.2 Eutanásia

Por se tratar de animais comerciais cultivados em piscicultura, e devido as alterações que podem ocorrer durante o transporte de animais vivos, a empresa fornecedora (Projeto Pacu Aquicultura Ltda), eutanasiou as amostras através de secção transversal da medula espinhal, após a região occipital, de acordo com descrição de Seichas-Filho et al., 2001. Em seguida os alevinos foram colocados em sacos plásticos de polietileno (esterilizados) e acondicionados em caixas de isopor contendo gelo. Após esses procedimentos os alevinos foram imediatamente transportados para o Laboratório de Microbiologia – *S-Inova Biotech* da UCDB.

5.3 Extração direta de DNA metagenômico microbiano

A extração direta de DNA metagenômico e a eletroforese em gel de agarose foram realizadas no Laboratório de Microbiologia – *S-Inova Biotech* da UCDB.

A extração direta de DNA metagenômico de três réplicas biológicas da microbiota associadas aos intestinos médios das amostras de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, foi realizada baseada no *Protocol of the Repeated Bead Beating Plus Column (RBB+C) Method*, elaborado por Yu e Morrison, 2004 (Tabela 1), mas com significativas alterações.

Tabela 1: *Protocol of the Repeated Bead Beating Plus Column (RBB+C) Method*, elaborado por Yu e Morrison, 2004.

I. Cell lysis:

1. Transfer 0.25 g of sample into a fresh 2-mL screw-cap tube. Add 1 mL of lysis buffer [500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, and 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)] and 0.4 g of sterile zirconia beads (0.3 g of 0.1 mm and 0.1 g of 0.5 mm).
2. Homogenize for 3 min at maximum speed on a Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA).
3. Incubate at 70°C for 15 min, with gentle shaking by hand every 5 min.
4. Centrifuge at 4°C for 5 min at 16,000× g. Transfer the supernatant to a fresh 2-mL Eppendorf® tube.
5. Add 300 µL of fresh lysis buffer to the lysis tube and repeat steps 2–4, and then pool the supernatant.

II. Precipitation of nucleic acids:

6. Add 260 µL of 10 M ammonium acetate to each lysate tube, mix well, and incubate on ice for 5 min.
7. Centrifuge at 4°C for 10 min at 16,000× g.
8. Transfer the supernatant to two 1.5-mL Eppendorf tubes, add one volume of isopropanol and mix well, and incubate on ice for 30 min.
9. Centrifuge at 4°C for 15 min at 16,000× g, remove the supernatant using aspiration, wash the nucleic acids pellet with 70% ethanol, and dry the pellet under vacuum for 3 min.
10. Dissolve the nucleic acid pellet in 100 µL of TE (Tris-EDTA) buffer and pool the two aliquots.

III. Removal of RNA, protein, and purification:

11. Add 2 µL of DNase-free RNase (10 mg/mL) and incubate at 37°C for 15 min.
12. Add 15 µL of proteinase K and 200 µL of Buffer AL (from the QIAamp DNA Stool Mini Kit), mix well, and incubate at 70°C for 10 min.
13. Add 200 µL of ethanol and mix well. Transfer to a QIAamp column and centrifuge at 16,000× g for 1 min.
14. Discard the flow through, add 500 µL of Buffer AW1 (Qiagen), and centrifuge for 1 min at room temperature.
15. Discard the flow through, add 500 µL of Buffer AW2 (Qiagen), and centrifuge for 1 min at room temperature.
16. Dry the column by centrifugation at room temperature for 1 min.
17. Add 200 µL of Buffer AE (Qiagen) and incubate at room temperature for 2 min.
18. Centrifuge at room temperature for 1 min to elute the DNA.
19. Aliquot the DNA solution into four tubes. Run 2 µL on a 0.8% gel to check the DNA quality.
20. Store the DNA solutions at -20°C.

No protocolo padronizado, na fase de lise celular, substituímos as esferas estéreis de zircônia por 20 µL de proteinase K (20 mg/mL). Na fase de precipitação dos ácidos nucleicos, substituímos o acetato de amônia por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Também na fase de precipitação dos ácidos nucleicos, o isopropanol foi substituído por etanol absoluto. A fase de purificação do DNA foi realizada durante a fase de precipitação dos ácidos nucleicos, e os componentes da fase de purificação foram substituídos por uma solução de precipitação proteica (PPS) [acetato de potássio (5 M), ácido acético, água destilada]. A incubação para precipitação do DNA por 30 minutos foi substituída por um período de 12 horas durante a noite. Na ressuspensão do precipitado obtido durante a fase de precipitação, o TE foi substituído por água *Milli-Q*.

Portanto, o protocolo padronizado seguiu os seguintes passos: transferiu-se 200 mg de intestino médio de alevino híbrido *P. corruscans* x *P. reticulatum* para um tubo de 2mL e adicionou-se 800 µL de tampão de lise [500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM de EDTA e 4% de SDS]. Homogeneizou-se durante 3 minutos no vortex e adicionou 20 µL de proteinase K (20 mg/mL). Incubou-se a 70 °C durante 45 minutos com a agitação suave a cada 10 minutos. Centrifugou-se a 4 °C durante 15 minutos a 13. 400 rpm. Transferiu-se 750 µL do sobrenadante para um tubo de 2 mL. Adicionou-se 350 µL tampão de lise [500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 de mM EDTA e 4% de SDS]. Centrifugou-se a 4 °C durante 15 minutos a 13. 400 rpm. Transferiu-se 750 µL do sobrenadante para um tubo de 2 mL. Adicionou-se 750 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e agitou no vortex por 30 segundos. Adicionou-se 400 µL de solução de precipitação proteica (PPS) [acetato de potássio (5M), ácido acético e água destilada] e agitou-se no vortex por 30 segundos. Centrifugou-se a 4 °C durante 10 minutos a 13. 400 rpm. Transferiu-se 750 µL do sobrenadante para um tubo de 2 mL. Adicionou-se 1mL de etanol absoluto gelado e deixou por um período de 12 horas durante a noite. Centrifugou-se a 4 °C durante 15 minutos a 13. 400 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se a 4 °C durante 5 minutos a 13. 400 rpm. Descartou-se o sobrenadante. Removeu-se os resíduos de etanol e deixou o precipitado secar por 1 hora. Adicionou-se 100 µL de água *Milli-Q*. Incubou-se no banho-maria a 50 °C durante 5 minutos.

O produto da extração, com a utilização de 150 ng/µL de cada uma das amostras de DNA metagenômico, foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a

0.8%, com duração de 90 minutos a 80 Volts, utilizando-se de tampão de TBE a 1% e comparado com marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Após a eletroforese, o gel foi corado por 5 minutos em solução contendo brometo de etídeo (2 µg/mL) e descorado em água destilada, por 15 minutos. Em seguida o gel foi fotografado em fotodocumentador.

Após a verificação da extração por eletroforese em gel de agarose, o DNA metagenômico microbiano do intestino médio das três réplicas biológicas foram quantificadas no equipamento *Qubit® (Life technologies)*, com a utilização do *Qubit® dsDNA HS Assay Kit, 100 assays*.

5.4 Amplificação do gene 16S rDNA

A PCR do gene 16S rDNA e a eletroforese em gel de agarose foram realizadas no Laboratório de Microbiologia – *S-Inova Biotech* da UCDB.

A amplificação do gene 16S rDNA de cada amostra foi realizado com um volume total de 20 µL composto por: 11,5 µL de H₂O Milli-Q, 1,6-3,9 ng de DNA extraído, a 5 pmol de cada oligonucleotídeo 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) e 1492R (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT), 1X de tampão da Taq polimerase (Invitrogen); 3,0 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O ciclo da PCR foi realizado com desnaturação inicial de 3 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95 °C, anelamento por 30 segundos a 53 °C e por último, extensão por 1 minuto e 40 segundos a 72°C, seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C e resfriamento a 13 °C. Para todas as reações PCR de foi feito um controle negativo, nesta amostra não foi acrescentado DNA, para verificação de contaminação das reações.

A PCR do gene 16S rDNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0.8%, com duração de 90 minutos a 80 Volts, utilizando-se de tampão de TBE a 1% e comparado com marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Após a eletroforese o gel foi corado por 5 minutos em solução contendo brometo de etídeo (2 µg/mL) e descorado em água destilada, por 15 minutos. Em seguida o gel foi fotografado em fotodocumentador.

6 RESULTADOS

6.1 Extração direta de DNA metagenômico microbiano

A extração direta de DNA metagenômico da comunidade microbiana associada ao intestino médio de cada uma das três réplicas biológicas dos alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, apresentou DNA metagenômico de alta massa molecular (Figura 7). Para cada amostra foi utilizado 150 ng/μL.

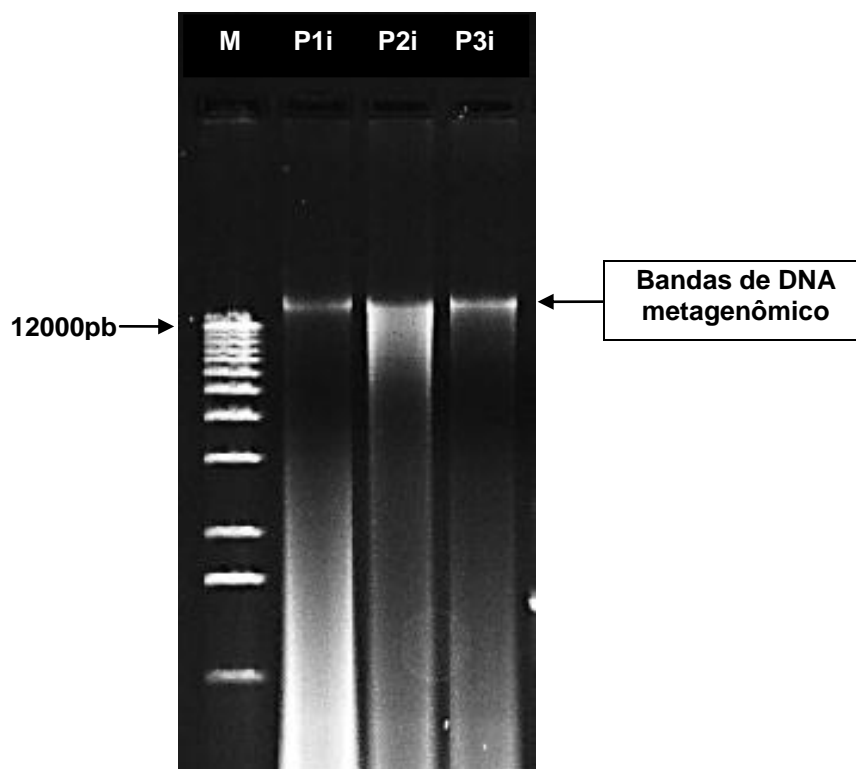


Figura 7. Gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo (2 μg/mL), contendo amostras de DNA metagenômico bacteriano oriundas do intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*. O DNA metagenômico dessas amostras é caracterizado por uma banda na região superior com aproximadamente 12000 pb, seguido de rastros na região inferior. M: marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*; P1i, P2i e P3i: DNA metagenômico das três réplicas biológicas.

Após a verificação em gel de agarose, as amostras foram quantificadas no equipamento Qubit® (*Life Technologies*), as concentrações das amostras variaram entre 67,8 ng/μL e 106 ng/μL (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de DNA obtido na extração mediante protocolo padronizado.

Quantificação Qubit®	
Amostra	ng/μL
P2i	78
P4i	106
P5i	67,8

6.2 Amplificação do gene 16S rDNA

As amplificações por PCRs do gene 16S rDNA das 3 réplicas biológicas da comunidade bacteriana intestinal dos alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, atingiu aproximadamente 1500 pares de base (pb) como esperado (Figura 8).

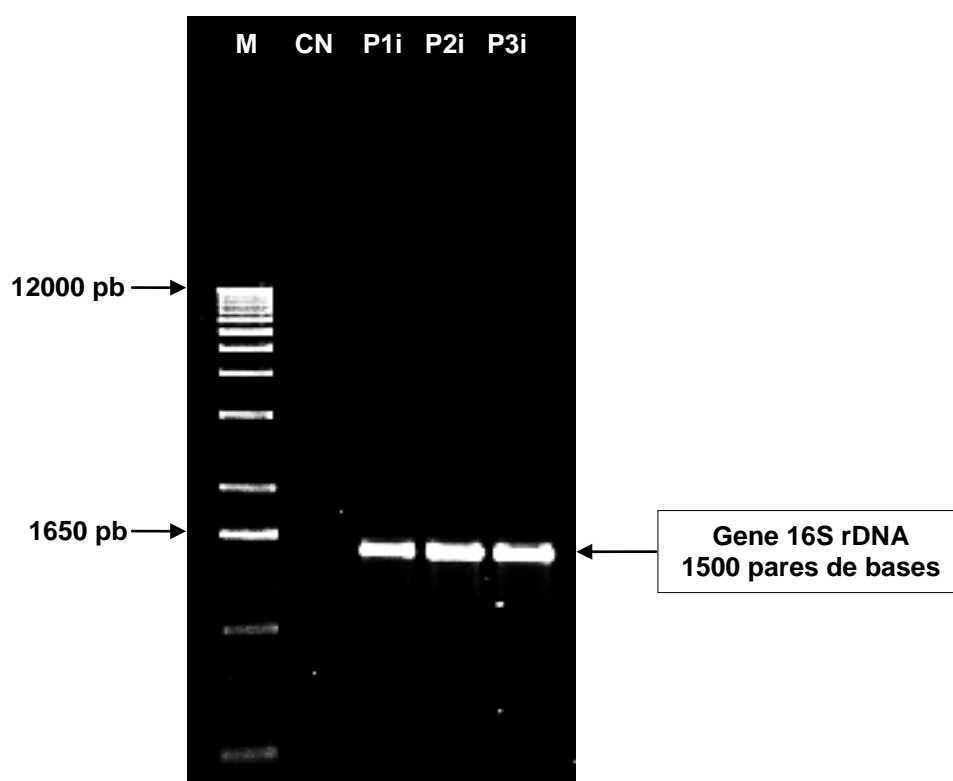


Figura 8. Produtos da PCR do gene 16S rDNA bacteriano oriundas do intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (2 μg/mL). O gene 16S rDNA dessas amostras contém aproximadamente 1500pb. M: marcador molecular *1kb Plus DNA Ladder*, P1i, P2i e P3i: PCR do gene 16S rDNA bacteriano de cada uma das três réplicas biológicas.

7 DISCUSSÃO

A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise das células presentes na amostra e a purificação do DNA. Após a lise das células, o DNA deve ser separado dos restos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas. Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de qualidade para as análises subsequentes (OLIVEIRA et al., 2007).

Em estudo realizado com fezes de bovinos (método RBB + C), o qual se utiliza de tampão de lise celular [500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de EDTA e 4% de SDS] evidenciou que o tampão de lise protege o DNA liberado da degradação por DNases (YU e MORRISON, 2004), e auxilia a proteinase K na digestão das proteínas, sendo que esta última, ainda está envolvida na separação das proteínas presentes no extrato celular.

Por outro lado, após a fase de lise celular, alguns protocolos contendo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) são frequentemente utilizados para precipitação e purificação de DNA. O fenol e o clorofórmio são muito eficientes para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrofóbica das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. A proteína que foi desnaturada pelo tratamento com fenol e clorofórmio forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa (OLIVEIRA et al., 2007).

Os benefícios da interação entre tampão de lise e proteinase K na presença de fenol foi evidenciado por Mesquita 2001, cujas técnicas utilizadas resultaram em material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA genômico pela técnica da PCR, com valores que variaram entre 63 ng/μL a 256 ng/μL de DNA genômico de tecido humano extraído das amostras.

Já interação entre o SDS e a proteinase K, foi evidenciada em estudo realizado com 1,5 mL de cultura de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (respectivamente) utilizando protocolo (1) de extração de DNA com SDS, e protocolo (2) SDS associado à proteinase K. O primeiro apresentou um rendimento de DNA de aproximadamente 1 µg para as bactérias gram-positivas e 2 µg para as gram-negativas, enquanto a metodologia com SDS e proteinase K (protocolo 2), apresentou um rendimento de DNA de aproximadamente 3 µg para as bactérias gram-positivas e 5 µg para as gram-negativas. O resultado desse estudo demonstrou que a extração de DNA utilizando a proteinase K associada ao SDS, apresentou um rendimento claramente maior, do que a metodologia com apenas SDS (BARATTO e MEGIOLARO, 2012).

Após a fase de lise celular, o protocolo RBB + C (citado acima), utiliza-se de isopropanol e etanol 70% para lavagem e precipitação dos ácidos nucleicos (YU & MORRISON, 2004). No entanto, outros protocolos usam etanol absoluto e etanol 70% para essa mesma finalidade (MESQUITA, 2001).

Quanto as demais impurezas (proteínas, RNA) presentes no DNA, o protocolo RBB + C, realiza essa etapa após a precipitação por etanol 70%, utilizando-se de proteinase K, RNase, dentre outros reagentes (YU e MORRISON, 2004). Mas o presente estudo utilizou-se de uma solução de precipitação protéica – PPS [acetato de potássio (5 M), ácido acético e água destilada]. Nesse contexto, a solução de precipitação protéica – PPS utilizada auxiliou o fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:25:1) na precipitação das proteínas e purificação do DNA.

Diante do exposto, na fase de lise celular, o protocolo padronizado no presente estudo, utilizou-se de tampão de lise celular [500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de EDTA e 4% de SDS], proteinase K (20 mg/mL). Na fase de precipitação e purificação dos ácidos nucleicos utilizou-se de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:25:1), solução de precipitação proteica [acetato de potássio (5M), ácido acético e água destilada], etanol absoluto e etanol 70%.

Ao analisarmos os três diferentes estudos, sendo elas: tecido humano (animal), cultura bacteriana e fezes bovinas (YU e MORRISON, 2004; BARATTO e MEGIOLARO, 2012; MESQUITA, 2001), é possível verificar que as amostras analisadas apresentam diferenças em relação ao intestino médio dos alevinos híbridos verificados pelo presente estudo. No entanto, o intestino médio dos alevinos híbridos, trata-se de um tecido animal, e sendo o foco do estudo a extração de DNA

bacteriano, os três protocolos analisados somatizam para que os ajustes deverão ser realizados no protocolo RBB + C para efetiva extração de DNA metagenômico. Nesse sentido, a padronização do protocolo ocorreu em virtude da amostragem ser proveniente de um tecido animal, portanto, ajustes foram necessários ao protocolo RBB + C (YU e MORRISON, 2004).

Portanto, a proteinase K (20 mg/mL) foi utilizada por ser eficaz na digestão de tecidos animais quando associada ao tampão de lise e remoção das proteínas quando associada ao fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:25:1), (MESQUITA 2001; BARATTO e MEGIOLARO, 2012). A solução de precipitação proteica [acetato de potássio a (5M), ácido acético e água destilada] foi adicionada por ser eficaz na remoção das proteínas quando associada ao fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:25:1).

Assim, com a aplicação do protocolo padronizado, foram obtidos 78 ng/μL, 106 ng/μL e 67,8 ng/μL de DNA metagenômico das amostras do intestino médio dos alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, respectivamente (Figura 7). Esses resultados são compatíveis com outros resultados, obtidos mediante protocolos padronizados, realizados por outros autores (MESQUITA, 2001; BARATTO e MEGIOLARO, 2012).

Comparando o protocolo padronizado, com estudos realizados em fezes de bovinos (250 mg), utilizando dois kits comerciais FastDNA SPIN Kit e QIAamp DNA Stool Mini Kit, obteve-se 38 ng/μL e 40,5 ng/μL de DNA metagenômico respectivamente (YU & MORRISON, 2004). Analisando esses dois kits comerciais com o protocolo padronizado, nota-se que os kits obtiveram um rendimento de DNA inferior.

Já em estudo realizado em uma espécie de musgo *Polytrichum juniperinum*, com a utilização de quatro kits comerciais, sendo eles, ChargeSwitch gDNA Plant Kit (Invitrogen), PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen), Norgen Plant/Fungi DNA isolation kit (Biotek) e Qiagen Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), obtiveram 35,5 ng/μL, 15,5 ng/μL, 26,6 ng/μL e 23,0 ng/μL respectivamente (ALVES, 2015). Os kits comerciais utilizados no trabalho de ALVES, 2015 também demonstraram resultados inferiores ao protocolo padronizado utilizado no presente estudo.

Finalmente comparamos o protocolo padronizado no presente estudo com o resultado do protocolo utilizado para extração de DNA metagenômico em estudo com

tecido intestinal de peixe o qual utilizou-se de tampão de extração [Tris-HCl 100 mM (pH 8,2), EDTA 100 mM (pH 8), NaCl 1,5 M], tampão de lise (SDS a 5%, lisozima, 5 mg/mL, sarkosil 1%, CTAB 1% e proteinase K, 5 mg/mL), fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), acetato de potássio 7,5 M e isopropanol. Esse protocolo obteve um rendimento de 304 ng/mg (TINA et al., 2014). Analisando o protocolo utilizado por Tina et al., 2014 evidenciamos que esse protocolo apresentou um rendimento superior ao padronizado no presente estudo, mas enfatizamos que o protocolo utilizado por Tina et al., 2014 além dos reagentes em comum, utilizou-se ainda de alguns reagentes dos quais não utilizamos, tais como: lisozima, 5 mg/mL, sarkosil 1%, CTAB 1%, clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e acetato de potássio 7,5 M.

Por fim, a comparação realizada com diferentes amostras biológicas, em relação às utilizadas no presente estudo, teve o principal intuito de demonstrar a eficiência do protocolo padronizado para a extração de DNA metagenômico, uma vez que são raros ou inexistentes os trabalhos de padronização de protocolos para extração de DNA metagenômico intestinal em alevinos referentes ao tema escolhido.

Avaliamos também a pureza do DNA da comunidade bacteriana associada ao intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, obtida mediante protocolo padronizado. Assim, a pureza da extração foi validada por meio da amplificação do gene 16S rDNA via PCR, produzidos a partir das diferentes amostras de DNA metagenômico. Nesse sentido, o resultado da amplificação do gene 16S rDNA das amostras foi verificado através da eletroforese em gel de agarose a 0,8%, onde foi possível observar a presença de bandas de DNA, com aproximadamente 1500 pares de bases (Figura 8), o que é compatível com gene em questão.

Enfatizamos ainda, que o protocolo padronizado no presente estudo é mais acessível e menos oneroso do que os *kits* comerciais. Nesse sentido, a padronização de protocolo para extração de DNA da comunidade microbiana associada ao intestino médio de alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum*, poderá contribuir para posterior compreensão da comunidade bacteriana da espécie em questão.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos, concluímos que o protocolo padronizado no presente estudo, foi eficiente na extração de DNA metagenômico, uma vez que o DNA extraído apresentou padrão de quantidade e pureza, bem como, foi possível realizar a amplificação do gene 16S rDNA. Portanto, o protocolo padronizado poderá ser utilizado como base para extração de DNA da comunidade microbiana associada ao intestino médio dos alevinos híbridos *P. corruscans* x *P. reticulatum* ou similares aos estudados.

9 REFERÊNCIAS

- ALVES, R. P.; JANNER, K. E.; PEREIRA, A. B.; VICTORIA, F. C. Avaliação de cinco protocolos de extração de DNA de *Polytrichum juniperinum* Hedw. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, VII, Alegrete, 2015. **Anais...** Alegrete, Universidade Federal do Pampa, v. 7, n. 2, 2015.
- BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.
- BARBOSA, O. N.; RAIZER, J.; GONDA, M. F.; SILVA, J. M. Desempenho e coeficiente intestinal de alevinos puros e híbridos de pintados em condicionamento alimentar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 12, p. 2621-2627, 2011.
- BIGNOTTO, et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, suppl., p. 681-689, 2009.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, DF, 2012. 129 p.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP, 1999.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U.A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1–38, 2007.
- CAL, J. A. Histologia do trato digestório do surubim-pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*–Agassiz, 1829). 87 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 30–339, 2007.
- CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, Â. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; V. E. MORAES. O surubim na aquicultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p.150-158, 2006.

DECLERCQ, A. M.; HAESBROUCK, F.; BROECK, W. V.; BOSSIER, P.; DECOSTERE, A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. **Veterinary Research**, v. 44, 2013.27 p.

DECOSTERE, A. *Flavobacterium columnare* infections in fish: the agent and its adhesion to the gill tissue. **Verhandelingen-Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België**, v. 64, n. 6, p. 421-30, 2002.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: contributing to food security and nutrition for all. Rome, 2016. 200 p.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 646-653, 2000.

FIGUEIREDO, Henrique César Pereira; LEAL, Carlos Augusto Gomes. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. especial, p. 08-14, 2008.

FRANZÉN, O.; HU, J.; BAO, X.; ITZKOWITZ, S. H.; PETER, I.; BASHIR, A. Improved OTU-picking using long-read 16S rRNA gene amplicon sequencing and generic hierarchical clustering. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HINOUE, L. A. K. A.; HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; ROTTA, M. A.; SENHORINI, J. A. **Princípios básicos para produção de surubins**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 26 p. (Embrapa Agropecuária Oeste, Documentos 99; Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 68; Embrapa Pantanal, Documentos 100).

IBGE. Produção da pecuária municipal 2014. Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014.

ISHIKAWA, M. M.; PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; JERÔNIMO, G. T.; RUSSO, M. R.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; MARTINS, M. L. **Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros**. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, 2012. 47 p. (Embrapa Agropecuária Oeste, Documentos 115).

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

LABARRÈRE, C.R.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E. A.; MELO, M. M. Eritrograma de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) mantidos em diferentes densidades de estocagem. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n.2, p.510-514, 2012.

LARSEN, A.M. et al. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1396-1404, 2014.

LOKESH, J.; KIRON, V. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin associated microbiota of Atlantic salmon. **Scientific Reports**, v. 6, 19707; doi: 10.1038/srep19707, 2016.

LOWREY, L.; WOODHAMS, D. C.; TACCHI, L.; SALINAS, I. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. **AEM Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, 2015

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p.1, 2015.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

NAYAK, S. K. (A). Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553–73, 2010.

NAYAK, S. K. (B). Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, 2010.

NASCIMENTO, T. S. R., et. al. Efeito do pH da água no equilíbrio iônico de alevinos de *Piaractus mesopotamicus*. In: Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce, 1.; Encontro de piscicultores de Mato Grosso do Sul, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2007.

OLIVEIRA, M. C. S. O.; REGITANO, L. C. A.; DINNYSROESE, A.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 38 p., 2007.

PÁDUA, S. B.; MARQUES D. P.; SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 3, p. 151-157, 2014.

PILARSK, F.; ISHIKAWA, M. M.; SEBASTIÃO, F. A.; PÁDUA, S. B.; SAKABE, R. **Columnarose: etiologia, sinais clínicos e envio de amostras para análise laboratorial**. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, 2011. 32 p. (Documentos, 109).

PROJETO PACU AQUICULTURA LTDA. Informativo Projeto Pacu: Criação dos surubins viveiros. Disponível em: <<http://www.projetopacu.com.br/arquivos/>> Acesso em: 10/12/2016.

RIBAS, F. H. W. Tanques para piscicultura. **Globo Rural**, 05/08/2011. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI255147-18289,00-TANQUES+PARA+PISCICULTURA.html>>. Acesso em: 01/10/2016.

RODRIGUES, S. S.; MENIN, E. Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringiana de *Pseudoplatystoma corruscans* (SPIX E AGASSIZ, 1829) (siluriformes, pimelodidae) em relação ao seu hábito alimentar. **Revista Ceres**, v. 53, n. 305, p. 135-146, 2006.

ROMERO, J.; RINGØ, E. MERRIFIELD, D. L. The Gut Microbiota of Fish. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**, 1ª ed., p. 75-100, 2014.

ROTTA, Marco Aurélio. **Ictiômetro para biometria de surubins (pintado e cachara)**. Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 28.)

SEIXAS-FILHO, J.T.; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A.T.M. et al. Anatomia funcional e morfometria do intestino no Teleostei (Pisces) de Água Doce Surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* - Agassiz, 1829). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1670-1680, 2001.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-90, 2010.

SUPLICY, F. M. Freshwater fish seed resources in Brazil. In: BONDAD-REANTASO, M.G. (ed.). **Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture**. Rome, FAO, p. 129–143, 2007. 628 p. (FAO Fisheries Technical Paper, 501)

TAVARES-DIAS, M.; ARAUJO, C. S. O.; PORTO, S. M. A.; VIANA, G. M.; MONTEIRO, P. C. **Sanidade do Tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem**. Macapá: Embrapa Amapá; Manaus: Universidade Nilton Lins, Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2013.

TINA, K. J.; BINDIYA E. S.; RAGHUL S. S.; SARITA G. B. Appraisal of extraction protocols for metagenomic DNA from fish gut microbiota. **International Journal of Advanced and Innovative Research** (2278-7844), v. 3, n. 6, p. 7-14, 2014.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Use of 16S rDNA gene sequence in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M., PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 253–262, 2001.

WANG, H. L.; WANG, H. R.; ZHANG, W. W.; SUN, L. Cloning and analysis of the *Vibrio harveyi* dam gene. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 47, n. 5, p. 855-859, 2007.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

YUAN, S.; COHEN, D. B.; RAVEL, J.; ABDO, Z.; FORNEY, L. J. Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. **PloSOne**, v. 7, n. 3, p. e33865, 2012.

VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; PRADO, F. D.; PORTO-FORESTI, F. Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 635-641, 2014.

VIEITES J. M.; GUAZZARONI, M. E.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Molecular methods to study complex microbial communities. **Methods in Molecular Biology**, v. 668, p. 1-37, 2010.

XIA, J. H.; LIN, G.; FU, G. H.; WAN, Z. Y.; LEE, M. WANG, L.; LIU, X. J.; YUE, G. H. The intestinal microbiome of fish under starvation. **BMC Genomics**, v. 15, 266, 2014.