

DNA BACTERIANO ENCONTRADO NO TRATO GASTROINTESTINAL DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S RNAr*

Isabela Calegari MOIA¹; Danielle de Carla DIAS²; Silvana Teresa TAPIA-PANIAGUA³; Leonardo TACHIBANA⁴

¹Mestranda, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca- APTA/SAA, São Paulo, SP
Bolsista CAPES isabelacmoia@gmail.com

²Jovem Pesquisador FAPESP, Instituto de Pesca - APTA/SAA, São Paulo, SP

³Group of Prophylaxis and Biocontrol of Fish Diseases, Department of Microbiology, University of Málaga, Spain;

⁴Instituto de Pesca - APTA/SAA, São Paulo, SP

*Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 2014/15390-1).

Palavras-chave: microbiota; interação; modulação; probiótico; sanidade; micro-organismo

INTRODUÇÃO

O conhecimento da microbiota intestinal permite um profundo entendimento sobre distúrbios e surtos de algumas doenças em peixes (WU *et al.*, 2010). Na aquicultura, a microbiota intestinal não existe como uma entidade isolada, mas em constante interação com o meio ambiente (CARDA-DIEGUÉZ *et al.*, 2014; GIATSIIS *et al.*, 2015; GIVENS *et al.*, 2015). Objetivou-se, com este trabalho, a obtenção de DNA bacteriano em intestinos de tilápia-do-nilo, por meio da amplificação da região 16S RNAr.

MATERIAL E MÉTODOS

O intestino mediano de tilápias foi coletado nos municípios de Santa Fé do Sul - SP, Toledo - PR e Paulo Afonso - BA. O DNA dos micro-organismos do muco intestinal foi extraído de acordo com MARTÍNEZ *et al.* (1998), com algumas modificações. As amostras foram tratadas com as soluções buffer ressuspensão (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8), buffer lise (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 0,1 M EDTA, 1% SDS, pH 8) e proteinase K, à 55°C por 2 h. Adicionou-se NaCl 6 M e a solução centrifugada. O sobrenadante foi misturado com a mesma quantidade de isopropanol, centrifugado e tratado com álcool 70%. O pelete de DNA foi suspenso em água ultrapura estéril. A confirmação visual da presença de DNA foi feita em eletroforese em gel de agarose 1% e observação sob luz ultravioleta. Após a confirmação, foi realizada a purificação das amostras com RNase (10 mg mL⁻¹) e isopropanol. O DNA foi

amplificado, utilizando *primers* 16S DNAr bacteriano 677R-GC (5'CGGGGCGGGGGCACGGGGGGATMTCTACGCATTTACCGCTAC-3') e 309-F (5'ACTCCTACGGGAGGCWGCAG-3'). A amplificação foi realizada por qPCR "Real Time", utilizando 9 µl da amostra, 10 µl de 2xSYBR Green supermix e 1 µl de *primer*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da aplicação da técnica de extração de DNA e qPCR demonstraram que o intestino da tilápia-do-nilo abriga espécies bacterianas com amplicons de 400 pb a 500 pb de comprimento. A técnica de PCR possibilitou a amplificação de genes e identificação de micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis, aumentando o conhecimento da biodiversidade (PACE *et al.*, 1986; WARD *et al.*, 1990; MUYZER *et al.*, 1993). Muitos autores têm utilizado técnicas moleculares para o estudo de microbiota intestinal. PEDROTTI *et al.* (2015), utilizando a técnica de extração de DNA, seguida por PCR-DGGE, demonstraram que o intestino de tilápia é abrigado por bactérias simbióticas amilolíticas e celulolíticas, devido ao hábito alimentar do peixe. TAPIA-PANIAGUA *et al.* (2011) relataram a presença de bactérias no intestino de dourada, *Sparus aurata*, por meio da técnica de PCR-DGGE, após a alimentação com probiótico contendo levedura (*Debaromyces hansonii*). CEREZUELA *et al.* (2012) utilizaram a mesma sequência de *primers* deste trabalho para investigar a microbiota intestinal de dourada, alimentada com dieta contendo probiótico e/ou microalga. Estes autores relataram que esta sequência produz amplicons de 470 pb de comprimento e que o probiótico pode modular as espécies bacterianas no intestino. Os resultados gerados no presente trabalho sinalizaram a presença de espécies bacterianas em intestino de tilápia-do-nilo e podem servir para a identificação de bactérias patogênicas ou probióticas de importância para a aquicultura.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação de extração de DNA seguida por qPCR é considerada uma escolha viável para a obtenção de sequências de DNA bacterianas presentes em amostras intestinais de tilápia-do-nilo. Futuros estudos, utilizando a técnica de DGGE e de sequenciamento de genes, serão realizados para identificar estas espécies bacterianas e compreender a sua interação com o ambiente.

REFERÊNCIAS

- CARDA-DIEGUÉZ, M.; MIRA, A.; FOUZ, B. 2014 Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2): 451-459.
- CEREZUELA, R.; FUMANAL, M.; TAPIA-PANIAGUA, S.T.; MESEGUER, J.; MORIÑIGO, M.A.; ESTEBAN, M.A. 2012 Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*, 350: 477-489.
- GIATSI, C.; SIPKEMA, D.; SMIDT, H.; HEILIG, H.; BENVENUTI, G.; VERRETH, J.; VERDEGEM, M. 2015 The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5: 18206.
- GIVENS, C.E.; RANSOM, B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J.T. 2015 Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518: 209-223.
- MARTÍNEZ, G.; SHAW, E.M.; CARRILO, M.; ZANUY, S. 1998 Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24: 138-139.
- MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. 1993 Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- PACE, N.R.; OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. 1986 Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45: 325-326.
- PEDROTTI, F.S.; DAVIES, S.; MERRIFIELD, D.L.; MARQUES, M.R.F.; FRAGA, A.P.M.; MOURIÑO, J.L.P.; FRACALOSI, D.M. 2015 The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46: 472-481.
- TAPIA-PANIAGUA, S.T.; REYES-BECERRIL, M.; ASCENCIO-VALLE, F.; ESTEBAN, M.A.; CLAVIJO, E.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. 2011 Modulation of the intestinal microbiota and immune system of farmed *Sparus aurata* by the administration of the yeast

Debaryomyces hansenii L2 in conjunction with inulin. *Aquaculture Research and Development*, S1:012.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 1990 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345: 63-65.

WU, S.; GAO, T.; ZHENG, Y.; WANG, W.; CHENG, Y.; WANG, G. 2010 Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1): 1-7.