

1 **FUNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**
2 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

3

4 **ALESSANDRO DEL'DUCA TEIXEIRA**

5

6

7

8

9

10 **CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM**
11 **SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE TILÁPIAS (*Oreochromis***
12 ***niloticus*) PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU***
13 **FLUORESCENTE (Fluorescent *In Situ* Hybridization – FISH)**

14

15

16

17

18 **RIO GRANDE, RS**

19 **2013**

20

21

22

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (Fluorescent *In Situ* Hybridization – FISH)

ALESSANDRO DEL'DUCA TEIXEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Dr. Paulo César Abreu

Co-orientadora: Dra. Dionéia E. Cesar

RIO GRANDE, RS

MAIO 2013

1

ATA DE APROVAÇÃO

2

- 3 Elaborada pela CCPPGAq, com assinatura de todos os membros da Banca
- 4 Examinadora, do coordenador e do aluno.

1

FICHA CATALOGRÁFICA

2

3 A Cargo da CCPGAAq.

1 ÍNDICE

2	Resumo.....	01
3	Abstract.....	02
4	Introdução Geral.....	03
5	Objetivos.....	08
6	Referências Bibliográficas.....	09
7	Capítulo 1: Comunidade Bacteriana da água e sedimento de viveiros e do trato	
8	intestinal de juvenis de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) caracterizada pela técnica	
9	de hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	13
10	Resumo.....	14
11	Capítulo 2: Avaliação da presença e eficiência de potenciais bactérias probióticas	
12	no intestino de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) utilizando a técnica de hibridização	
13	<i>in situ</i> fluorescente.....	15
14	Resumo.....	16
15	Capítulo 3: Uso da técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente para caracterização	
16	da comunidade bacteriana nitrificante na coluna de água e no biofilme de um	
17	sistema de recirculação de água de produção de tilápia (<i>Oreochromis</i>	
18	<i>niloticus</i>).....	17
19	Resumo.....	19
20	Introdução.....	20
21	Material e Métodos.....	21
22	Resultados.....	23
23	Discussão.....	28
24	Agradecimentos.....	32
25	Referências.....	33

1	Discussão Geral.....	39
2	Bactérias no trato intestinal.....	39
3	Bactérias na qualidade de água.....	41
4	A Técnica de FISH como instrumento de avaliação de bactérias na	
5	aquacultura.....	42
6	Perspectivas de Trabalhos Futuros.....	43
7	Referências.....	44
8	Anexo 1: Bacterial Community of Pond's Water, Sediment and in the Guts of	
9	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Juveniles Characterized by Fluorescent <i>In Situ</i>	
10	Hybridization Technique.....	46
11	Abstract.....	47
12	Introduction.....	47
13	Material and Methods.....	48
14	Results.....	51
15	Discussion.....	52
16	Acknowledgements.....	56
17	References.....	56
18	Anexo 2: Evaluation of the Presence and Efficiency of Potential Probiotic Bacteria	
19	in the Gut of Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Using the Fluorescent <i>In Situ</i>	
20	Hybridization Technique.....	70

1 DEDICATÓRIA

2

3

4

5

6

7

8

0

10

1

18

À minha mãe Angela, a meus irmãos Alex e Allan

e à minha eterna paixão Mariana

1 AGRADECIMENTOS

2 Agradeço:

3 Ao meu orientador, Dr. Paulo Abreu, sobretudo pela confiança e no desenvolvimento
4 dos trabalhos e pelos ensinamentos relacionados especificamente a esta Tese ou não,
5 que muito contribuíram e contribuirão para meu desenvolvimento profissional.

6 À minha co-orientadora, Dra. Dionéia Cesar, por há cerca de 10 anos atrás ter me
7 mostrado “a primeira bactéria”, e continuar acreditando e confiando no
8 desenvolvimento dos meus trabalhos.

9 À banca, Dra. Gertrudes Corção, Dr. Luis Fernando Marins, Dr. Luis Sampaio e Dr.
10 Marcelo Tesser, por aceitar o convite de participar e contribuir com esta Tese.

11 Aos Dr. Luis Sampaio e Dr. Marcelo Tesser, por fazerem parte da banca de
12 acompanhamento do meu doutoramento, contribuindo e preocupando-se com o
13 desenvolvimento dos trabalhos.

14 A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura/FURG, pelos
15 ensinamentos e discussões, nas aulas ou fora delas, sobre diversos temas importantes
16 para meu crescimento profissional.

17 Aos revisores (embora anônimos) e os editores das revistas aos quais os trabalhos desta
18 Tese já foram submetidos e/ou publicados, por melhorarem o nível dos trabalhos com
19 questões e sugestões importantes e pertinentes.

20 Aos funcionários da Estação Marinha de Aquicultura e do Programa de Pós-Graduação
21 em Aquicultura, pela atenção durante todo o período do meu doutoramento.

22 Aos mestrandos, mestres, doutorandos e doutores pelo Programa de Pós-Graduação em
23 Aquicultura, os quais não listarei para não cometer o “pecado do esquecimento”. De
24 qualquer forma, obrigado a todos que foram fundamentais no meu crescimento pessoal
25 e profissional com conversas científicas/acadêmicas ou não.

26 Ao Roni e Roberta, que foram quem primeiro me receberam em Rio Grande, abrindo as
27 portas de casa para eu poder conhecer a cidade.

1 Ao Leonardo (Carioca) e Paulo (Gaúcho), que desde o primeiro dia que estive em Rio
2 Grande como doutorando, foram muito mais que parceiros de casa, mas amigos que
3 carregarei por toda a vida. Muito obrigado pelos aprendizados, ensinamentos e
4 convivência.

5 À Dra. Cíntia Coelho e aos alunos do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de
6 Microrganismos/UFJF, em especial, Davi Barreto, Julliane Medeiros, Edmo Rodrigues,
7 Raiza Azevedo, Yasmine Marçola, Beatriz Macedo, que participaram indireta e
8 diretamente (como os citados) no desenvolvimento dos trabalhos.

9 Aos alunos e professores do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e
10 Microorganismos Marinhos/FURG, pela sempre ótima convivência em todos os
11 âmbitos. Em especial Haig They e Lise, contemporâneos de doutorado com os trabalhos
12 ligados a micro-organismos, pelas várias discussões importantes e pertinentes (ou não).

13 Aos professores e alunos do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e
14 Imunologia/UFJF, em especial, Dr. Cláudio Diniz, Dra. Vânia Silva, Juliana Resende,
15 Cláudia Fontes, Thiago Nascimento, pelo apoio logístico e pelas discussões sobre os
16 experimentos.

17 A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, em especial, aos funcionários
18 lotados na Fazenda Experimental de Leopoldina, Dr. Thiago Freato, Dr. Alexmilliano,
19 Jardell Peixoto, Zé Lopes, Geraldo, Aloan, pelo apoio logístico das coletas e dos
20 experimentos.

21 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
22 concessão de bolsa e taxa de bancada, que muito contribuíram para o desenvolvimento
23 destes trabalhos.

24 Aos Chefes de Departamento e Diretores do Câmpus Juiz de Fora do IF Sudeste MG,
25 pela compreensão e auxílio sempre que preciso em flexibilizar meus horários para eu
26 poder cumprir os requisitos como aluno de doutorado.

27 Aos professores (Adriano, Sônia e José Augusto) e estagiário docente (Cassiano) do
28 Núcleo de Biologia do Câmpus Juiz de Fora, por entender os compromissos de meu
29 doutoramento e sempre com conversas pertinentes. E aos demais professores do

1 Câmpus que permitiram alterações em seus horários de aulas para que eu conseguisse
2 uma melhor “condensação” das minhas.

3 À minha mãe Angela, por acreditar em mim, mesmo não entendendo muito sobre o
4 tema dos trabalhos, desde que escolhi ser biólogo e por confiar e apoiar no que foi
5 preciso durante todos meus anos de estudos e pesquisas.

6 Aos meus irmãos Alex e Allan, por sempre me dizerem o quanto orgulhosos são de mim
7 por estar fazendo o que eu gosto e desempenhando um “importante papel” (como
8 sempre dizem). Aos meus sobrinhos Lucas, Luisa e Júlia, por serem especiais nas suas
9 criancices, mesmo tendo menos contato do que gostaria.

10 À minha companheira (no sentido mais amplo que esta palavra possa ter) Mariana, pela
11 companhia, discussões (boas), carinho, conversas, discussões (ruins), amor... Enfim, por
12 aceitar estar comigo nos tempos fáceis e difíceis de todo meu caminhar pessoal e
13 científico e por me fazer sempre crescer.

1 RESUMO

2 Para aumentar o crescimento da aquacultura, é urgente otimizar os sistemas de
3 produção, tornando-os cada vez mais eficientes e ambientalmente amigáveis. As
4 bactérias presentes nos sistemas aquícolas são de grande importância para seu melhor
5 funcionamento e sanidade. Assim, entender a interação da microbiota com os animais
6 produzidos é importante para se estabelecer estratégias de controle de doenças e de
7 manejo da qualidade da água. Para isso, quantificar e identificar de forma rápida e
8 precisa a comunidade bacteriana é essencial para melhorar as condições de produção.
9 Nesta Tese, foi utilizada uma técnica de biologia molecular, a Hibridização *In Situ*
10 Fluorescente (Fluorescent *In Situ* Hybridization – FISH), para identificar e quantificar
11 bactérias com o intuito de (1) identificar a similaridade da comunidade bacteriana do
12 trato intestinal de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o ambiente de produção (água e
13 sedimento); (2) verificar a eficiência de colonização e ação de uma bactéria
14 potencialmente probiótica, previamente isolada do próprio sistema de produção e (3)
15 avaliar variações de grupos de bactérias nitrificantes na água e no biofilme em um
16 sistema de recirculação de água (RAS) para produção de tilápias. No capítulo 1,
17 observamos que a composição da comunidade bacteriana do trato gastro-intestinal das
18 tilápias foi mais similar à comunidade da água, em comparação a microbiota do
19 sedimento do viveiro. No capítulo 2, *Bacillus* sp., que tem grande potencial probiótico e
20 foi isolado do próprio sistema de produção, apresentou grande abundância no intestino
21 das tilápias, após ser oferecida juntamente com a ração. Isso indicou boa incorporação
22 deste isolado a microbiota do trato intestinal destes peixes. Verificou-se também que
23 *Bacillus* sp. foi capaz de controlar duas espécies de bactérias patogênicas, que
24 apresentaram menores abundâncias na presença deste micro-organismo probiótico. No
25 capítulo 3, observou-se que o processo de nitrificação no RAS está relacionado,
26 principalmente, às bactérias nitrificantes presentes no biofilme, mas não na água. De
27 forma geral, a técnica FISH foi eficaz para monitorar as mudanças qualitativas e
28 quantitativas das comunidades bacterianas em todos os trabalhos desenvolvidos. Assim,
29 podemos dizer que esta técnica mostrou grande potencial para futuros estudos da
30 ecologia de micro-organismos em sistemas de aquacultura.

1 ABSTRACT

2 To increase the aquaculture production, it is imperative to optimize the production
3 systems, aiming to make them more efficient and environmental friendly. Bacteria
4 found in aquaculture systems are of great importance in order to keep the system
5 healthy and functioning. Hence, understanding the interaction between the microbiota
6 and the animal farmed is important to establish strategies for diseases control and water
7 quality management. Thus, quick and precise quantification and identification of the
8 bacterial community is essential to improve the aquaculture production. In this Thesis, a
9 molecular technique, the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH), was used to identify
10 and quantify bacteria in order to (1) analyse the similarity of the bacterial community in
11 the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) with the bacterial community in the
12 aquaculture system environment (water and sediment), (2) verify the colonization
13 efficiency and the effect of a potential probiotic bacteria, previously isolated from the
14 aquaculture system, in the gut of tilapia and (3) analyse the variation in nitrifying
15 bacterial groups in the water and in the biofilm of a recirculation aquaculture system
16 (RAS) to tilapia production. In chapter 1, we observed that the bacterial community
17 composition of the tilapia's gut was more similar to the water community than to the
18 microbiota of the pond's sediment. In the chapter 2, the potential probiotic bacteria
19 *Bacillus* sp., which was isolated from the system, was found in high abundance in the
20 tilapia's gut was found, indicating a good incorporation of this isolate in the fish's gut.
21 We could also verify that *Bacillus* sp. was able to control two species of pathogenic
22 bacteria, which showed lower abundances in the presence of this microorganism. In
23 chapter 3, it was observed that the nitrification process in the RAS was mainly related to
24 the nitrifying bacteria present in the biofilm, but not into the water. In conclusion, the
25 FISH technique was effective in monitoring qualitatively and quantitatively the
26 microbiological changes in all developed studies, showing great potential for further
27 studies on microbial ecology in aquaculture systems.

1 INTRODUÇÃO GERAL

2 A aquacultura é uma das atividades econômicas que mais cresce no Brasil e no
3 mundo. Entretanto, este meio de produção de alimentos terá que aumentar ainda mais
4 sua atividade para atender minimamente o consumo da crescente população mundial
5 (FAO, 2012). O aproveitamento deste setor produtivo poderia ser ainda maior,
6 especialmente, se as doenças fossem controladas e os problemas sanitários fossem
7 sanados (Queiroz et al., 2002). Além disso, esta é mais uma atividade econômica que
8 compete pela água disponível, apresentando riscos de deterioração do corpo d'água
9 receptor dos efluentes, contribuindo para o declínio da qualidade ambiental, social e
10 econômica (Tiago e GIANESELLA, 2003). Desta forma, o principal desafio é atender esta
11 demanda crescente com alimentos de qualidade e seguros. Entretanto, para que
12 aquacultura continue o seu crescimento é de suma importância o aumento da
13 produtividade e da diversificação de produtos, o que demanda a incorporação de novas
14 técnicas (Cardoso, 2007).

15 A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais produzida no Brasil, contando
16 inclusive com incentivos de produção pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).
17 Estes incentivos, aliados a relativa facilidade de produção desta espécie devido à
18 rusticidade e pacotes tecnológicos já estabelecidos, fizeram com que as tilápias fossem
19 produzidas com sucesso, principalmente, nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste do país
20 (Kubtiza et al., 2012b). A produção nacional desta espécie cresceu 17% ao ano entre
21 2000 e 2010, enquanto o crescimento médio da aquicultura foi de 10% no mesmo
22 período (Kubtiza et al., 2012a). Mesmo assim, importantes doenças bacterianas afetam
23 as produções de tilápias. As doenças bacterianas com maiores registros são provocadas,
24 principalmente, pelos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*,
25 *Edwardsiella*, *Photobacterium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Além das perdas
26 econômicas causadas pela mortalidade e pela perda de peso dos animais, algumas destas
27 espécies bacterianas são causadoras de doenças oportunistas em humanos,
28 principalmente em pessoas imunocomprometidas (Flick, 2008; Soto et al., 2009). Casos
29 de doenças bacterianas emergentes reportados em tilápias, como na Costa Rica com
30 *Francisella* sp. (Soto et al., 2009) e no Brasil com *Lactococcus garviae* (Evans et al.,

1 2009), mostram a necessidade de mais estudos nesta área para um melhor manejo
2 sanitário e segurança alimentar.

3 Novas técnicas para a produção aquícola ambientalmente segura devem ser
4 desenvolvidas para expandir a quantidade produzida, mas também promover o
5 aproveitamento racional dos recursos naturais. Sob esta perspectiva, a ação e a
6 funcionalidade dos micro-organismos nestes ambientes devem ser avaliadas para
7 garantir o incremento e segurança nos processos produtivos. Isto porque, além dos
8 animais produzidos para consumo, os sistemas de aquacultura são também formados
9 por uma complexa comunidade de micro-organismos que precisam ser manejadas
10 adequadamente para não haver perdas de complexidade e funcionalidade. Isso pode
11 tornar a produção mais econômica e com menor impacto ambiental. Assim, entender a
12 ecologia microbiana nos sistemas de produção de animais aquáticos é importante para
13 melhorar a produtividade destes sistemas (Moriarty, 1997).

14 Os avanços dos estudos da ecologia microbiana na aquacultura, oceanografia e
15 da limnologia, principalmente com o advento de técnicas de biologia molecular,
16 permitiram uma melhor caracterização das funções dos micro-organismos nestes
17 ecossistemas. Os micro-organismos têm papéis essenciais dentro da funcionalidade dos
18 ecossistemas aquáticos como a produtividade, ciclagem de nutrientes, nutrição dos
19 animais, manutenção da qualidade da água, controle de doenças e dos impactos
20 ambientais causados pelos efluentes (Gatesoupe, 1999; Moriarty 1999). Isto destoa
21 bastante da ideia errônea que se tem de que as bactérias seriam apenas agentes
22 patogênicos que afetam negativamente a produção de organismos aquáticos.

23 A ocorrência micro-organismos patogênicos é, sem dúvida, um dos principais
24 problemas que colocam em risco a produção aquícola (Moriarty, 1997; Wang et al.,
25 2008). Entretanto, a ampliação do conhecimento sobre a microbiota pode levar à
26 identificação de micro-organismos capazes controlar as próprias bactérias patogênicas,
27 otimizando a produção e proporcionando um maior retorno econômico para os
28 produtores. Por exemplo, pode-se identificar, isolar e utilizar micro-organismos
29 probióticos que controlam as bactérias patogênicas pela produção de substâncias
30 antibióticas, ou competem com estas por nutrientes. Entretanto, a avaliação destes

1 probióticos também se faz necessária para que impactos indesejáveis como, por
2 exemplo, a introdução de bactérias multi-resistentes, não aconteçam (Gatesoupe, 1999).

3 A ação de bactérias probióticas se dá de maneira direta sobre os animais
4 produzidos, ou sobre os micro-organismos patogênicos. Os probióticos podem atuar
5 estimulando no hospedeiro uma resposta imunológica melhor e mais rápidas (Aly et al.
6 2008; Ridha e Azad, 2012), ou controlando populações patogênicas no ambiente e nos
7 hospedeiros (Avella et al., 2011; Gopalakannan e Arul, 2011; Nayak e Mukherjee,
8 2011). As bactérias probióticas podem, ainda, estimular o apetite e aumentar o ganho
9 nutricional dos hospedeiros com a produção de vitaminas, eliminação de compostos
10 tóxicos da dieta, ou por decomposição de componentes não digeríveis pelo animal
11 (Irianto e Austin, 2002).

12 Além disso, algumas bactérias podem contribuir indiretamente para a saúde dos
13 peixes, mantendo água do sistema de produção com boa qualidade, diminuindo o stress
14 dos organismos que estão sendo produzidos (Panigrahi e Azad, 2007). Essas bactérias
15 têm participação na transformação e absorção de compostos que são tóxicos para os
16 animais produzidos. Por exemplo, a atividade bacteriana é importante para evitar o
17 acúmulo de amônia e nitrito nos ambientes de produção. Estes dois compostos
18 nitrogenados são tóxicos aos animais quando em altas concentrações nas produções
19 (Frances et al., 1998; Wicks et al., 2002). Nestes processos de remoção dos compostos
20 nitrogenados, as bactérias autotróficas transformam a amônia a nitrato (nitrificação) e as
21 bactérias heterotróficas incorporam estes compostos à nova biomassa formada (Ebeling
22 et al., 2006). Desta forma, a atividade destas bactérias permite que os organismos que
23 estão sendo produzidos não sofram intoxicações que podem levar a morte, ou a um
24 baixo crescimento.

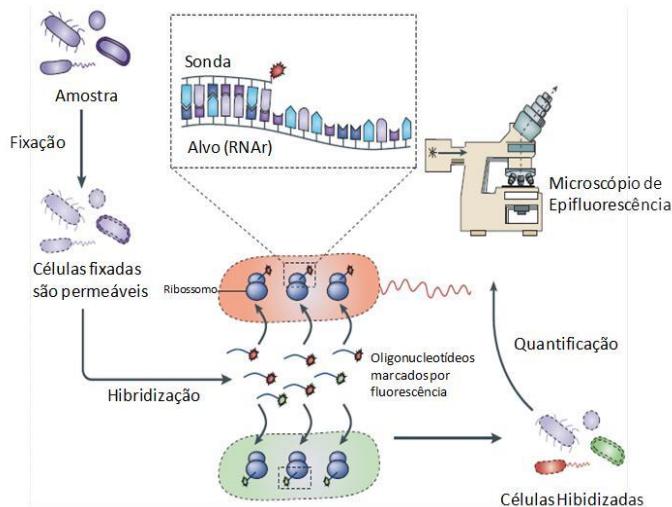
25 Para entender melhor o papel das bactérias nos sistemas de aquacultura e nos
26 próprios animais aquáticos que estão sendo produzidos, é essencial se realizar a
27 identificação e quantificação das bactérias para estabelecer estratégias de prevenção e
28 combate de doenças, bem como de melhoria da qualidade da água (Moriarty, 1997;
29 Hopkins et al., 2001). Entretanto, metodologias clássicas que necessitam realizar o
30 isolamento e cultivo para avaliar a diversidade e abundância bacterianas podem
31 apresentar dados irreais, pois muitas espécies de bactérias não crescem nos meios de

1 cultivo comumente utilizados (Asfie et al., 2003; Temmerman et al., 2004; Dhanasiri et
2 al., 2011). Desta forma, técnicas para caracterização de bactérias não cultiváveis são de
3 fundamental importância para que a complexidade da comunidade bacteriana nestes
4 sistemas seja determinada.

5 Os avanços das novas técnicas baseadas na biologia molecular permitem a
6 identificação de grupos ou espécies bacterianas cultiváveis e não-cultiváveis. As
7 técnicas moleculares independentes de cultivo, portanto, são ferramentas mais eficientes
8 e precisas para se identificar e quantificar os micro-organismos (Merrifield et al., 2010).
9 Existem várias técnicas de biologia molecular que podem caracterizar e quantificar o
10 DNA extraído das comunidades bacterianas. No entanto, os métodos baseados na
11 replicação de DNA por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) não dão informações sobre
12 a abundância, tamanho ou morfologia das células bacterianas. Por exemplo, as técnicas
13 de “fingerprinting” como DGGE e TGGE, que usam DNA replicado pelo PCR, são
14 utilizadas para estudar a dinâmica e o comportamento da microbiota em diferentes
15 ambientes, caracterizando a complexidade desta comunidade. Entretanto, estas técnicas
16 não fornecem informações sobre possíveis variações que ocorrem na abundância dos
17 principais grupos ao longo do tempo. Além disso, o DNA de bactérias inativas, ou
18 mortas também pode ser replicado caracterizando organismos que não são ativos (Qi et
19 al., 2009; Sun et al., 2011).

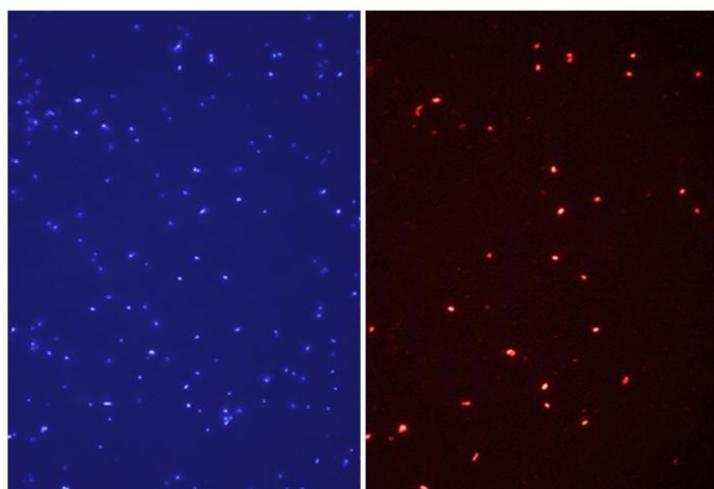
20 Uma outra técnica molecular bastante utilizada, mas diferente da
21 “fingerprinting” é a Hibridização *In Situ* Fluorescente (“Fluorescent *In Situ*
22 Hybridization” – FISH). Basicamente, esta utiliza sondas fluorescentes ligadas à
23 oligonucleotídeos complementares ao RNA ribossomal das bactérias (Fig. 1). Esta
24 técnica permite, inclusive, a identificação filogenética de bactérias sem a necessidade de
25 cultivo prévio. As sondas fluorescentes podem ser desenhadas para serem específicas e
26 reconhecerem apenas uma espécie, ou grandes grupos bacterianos. A identificação de
27 espécies se dá através de marcadores construídos a partir de oligonucleotídeos de RNAr,
28 que apresenta propriedade conservativa quanto a mutações e está presente em todos os
29 organismos (Amann et al., 1990) (Fig. 1). As células marcadas com a sonda são
30 diferenciadas pelo uso de filtros de luz específicos (Fig. 2). Assim, as células
31 bacterianas marcadas (identificando grupos, gêneros ou espécies de bactérias) são

1 visualizadas com auxílio de microscópios de epifluorescência ou confocal, ou pela
2 citometria de fluxo (Zwirglmaier, 2005). Portanto, a técnica FISH permite a
3 visualização, identificação e contagem direta das células bacterianas especificamente
4 marcadas. Através dela, podemos acompanhar alterações na estrutura da comunidade
5 microbiana (taxa e o número de bactérias de cada taxa) com maior rapidez e precisão.



6
7 Figura 1. Resumo da técnica de FISH, desde a coleta até a contagem das bactérias por microscopia de
8 epifluorescência. Primeiramente, a amostra é fixada com paraformaldeído para estabilizar e permeabilizar
9 as membranas celulares das bactérias. Uma solução com a sonda, composta por um oligonucleotídeo marcado
10 com um fluorocromo, é então adicionada e se liga aos seus alvos intracelulares (RNA ribossomal). Em
11 seguida, a amostra está pronta para a identificação e quantificação das células pela microscopia de
12 epifluorescência (adaptado de Amann e Fuchs, 2008).

13



14

15 Figura 2. Fotomicrografias que demonstram a visualização de bactérias pela técnica de FISH. À esquerda,
16 de bactérias coradas com DAPI (abundância bacteriana total) e, à direita, marcadas por sonda específica
17 identificando o grupo-alvo de interesse (abundância bacteriana específica) (Fotos: Matthew Cottrell).

1 Na aquacultura a técnica de FISH ainda é pouco utilizada. Os trabalhos
2 publicados tratam da caracterização da microbiota de água e efluentes (Garcia e Olmos,
3 2007; Paungfoo et al., 2007; Payne et al., 2007; Pereira et al., 2011), da formação de
4 biofilme (Cytryn et al., 2006) e da microbiota do trato intestinal de peixes (Asfie et al.,
5 2003; Balcázar et al., 2010; Huber et al., 2004). Entretanto, esta técnica pode ser
6 utilizada em qualquer pesquisa em que a visualização direta das bactérias seja
7 necessária, a fim de melhor compreender os processos fisiológicos e metabólicos. A
8 partir destas quantificações, medidas podem ser tomadas para, por exemplo, i)
9 identificar bactérias patogênicas e realizar o controle destas no sistema; ii) verificar a
10 eficiência da utilização de probióticos e iii) avaliar a presença e dinâmica de bactérias
11 nitrificantes.

12 Considerando-se estas perspectivas, esta Tese foi desenvolvida de forma a
13 avaliar a comunidade bacteriana em sistemas de produção de tilápias (*Oreochromis*
14 *niloticus*) na Fazenda Experimental de Leopoldina, Minas Gerais (Empresa de Pesquisa
15 Agropecuária de Minas Gerais – FELP/EPAMIG), utilizando a técnica de FISH para
16 caracterização das bactérias em diferentes compartimentos do sistema de produção
17 (água e sedimento), no trato intestinal dos peixes e no biofiltro formado para a
18 eliminação de compostos nitrogenados tóxicos. A Tese foi dividida em três capítulos,
19 cada um destacando pontos importantes de se avaliar para se entender melhor a
20 composição e funcionamento da comunidade bacteriana nos sistemas de produção.

21 O capítulo 1 mostra a importância de se identificar as bactérias no ambiente de
22 produção e nos peixes produzidos. Neste capítulo, destaca-se a alta similaridade da
23 microbiota intestinal das tilápias com a água do ambiente de produção, mas não com o
24 sedimento do viveiro. Isso indica que monitorar a água de produção é eficaz para
25 identificar as possíveis mudanças microbiológicas que possam prejudicar os animais.

26 No capítulo 2 utilizou-se o FISH como ferramenta para avaliar isolados
27 bacterianos com capacidade probiótica. A técnica de FISH permitiu monitorar e avaliar
28 a eficiência destes probióticos, quanto ao seu estabelecimento no hospedeiro e no
29 controle de patógenos.

1 O capítulo 3 apresenta os resultados do uso do FISH para se caracterizar e
2 acompanhar a variação de bactérias nitrificantes na água e no biofilme de um sistema de
3 recirculação de água (RAS) com a presença de tilápias. As bactérias nitrificantes do
4 biofilme foram predominantes no processo de nitrificação, mantendo os compostos
5 nitrogenados tóxicos aos animais em níveis aceitáveis para a produção destes.

6

7 **OBJETIVOS**

8 **Objetivos Gerais:**

9 - Caracterizar a comunidade bacteriana no sistema de produção e no trato gastro-
10 intestinal de tilápias (*Oreochromis niloticus*) através da técnica de Hibridização *In Situ*
11 Fluorescente (“Fluorescent *In Situ* Hybridization” – FISH).

12

13 **Objetivos Específicos:**

14 - Caracterizar a comunidade bacteriana da água e sedimento dos viveiros, em
15 comparação com aquela presente no trato gastrointestinal das tilápias (*Oreochromis*
16 *niloticus*)

17 - Verificar a eficiência de colonização do trato intestinal do peixe e controle de
18 patógenos por uma bactéria com potencial probiótico, isolada do próprio ambiente de
19 produção de tilávia.

20 - Caracterizar o biofilme bacteriano nos tanques de produção de tilávia e no biofiltro de
21 sistemas de recirculação de água do RAS.

22

23 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

24 Aly S, Mohamed M, John G (2008) Effect of probiotic on the survival, growth and
25 challenge infection in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research
26 39: 647-656.

- 1 Amann R, Fuchs B (2008) Single-cell identification in microbial communities by
2 improved fluorescent *in situ* hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* 6:
3 339-348.
- 4 Amann R, Krumholz L, Stahl D (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole
5 cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology.
6 *Journal of Bacteriology* 172: 726-770.
- 7 Asfie M, Yoshijima T, Sugita H (2003) Characterization of the goldfish fecal microflora
8 by the fluorescent *in situ* hybridization method. *Fisheries Science* 69: 21-26.
- 9 Avella M, Olivotto I, Silvi S, Ribecco C, Cresci A, Palermo F, Polzonetti A, Carnevali
10 O (2011) Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*)
11 larviculture. *Aquaculture* 315: 384-393.
- 12 Balcázar J, Lee N, Pintado J, Planas M (2010) Phylogenetic characterization and *in situ*
13 detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*)
14 in captivity. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 71-77.
- 15 Cardoso E (2007) Panorama da pisicultura mineira e perspectivas para o setor. *Anais do*
16 *III Seminário de aquicultura, maricultura e pesca aquicultura*. Belo Horizonte, MG, p.
17 39-52.
- 18 Cytryn E, Minz D, Gieseke A, Rijn J (2006) Transient development of filamentous
19 *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor.
20 *FEMS Microbiology Letters* 256: 22-29.
- 21 Dhanasiri A, Brunvold L, Brinchmann M, Korsnes K, Bergh O, Kiron V (2011)
22 Changes in the intestinal microbiota in wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive
23 rearing. *Microbial Ecology* 61: 20-30.
- 24 Ebeling J, Timmons M, Bisogni J (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of
25 photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in
26 aquaculture systems. *Aquaculture* 257: 346-358.
- 27 Evans J, Klesius P, Shoemaker C (2009) First isolation and characterization of
28 *Lactococcus garvieae* from Brazilian nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and

- 1 pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). Journal of Fish Diseases 32:
2 943-951.
- 3 FAO (2012) The state of world fisheries and aquaculture. Disponível em:
4 <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>
- 5 Flick G. (2008) Bacterial, chemical, residues impact tilapia quality. Global Aquaculture
6 Advocate 11: 32-33.
- 7 Frances J, Allan G, Nowak B (1998) The effects of nitrite on the short-term growth of
8 silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture 163: 63-72.
- 9 Garcia A, Olmos J (2007) Quantification by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria
10 associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery. Aquaculture
11 262: 211-218.
- 12 Gatesoupe F (1999) The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180:147-165.
- 13 Gopalakannan A, Arul V (2011) Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium*
14 MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic
15 septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. Aquacult. Int. doi:10.1007/s10499-011-
16 9415-2.
- 17 Hopkins M, Sharp R, Macfarlane G (2001) Age and disease related changes in intestinal
18 bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community
19 cellular fatty acid profiles. Gut 48: 198-205.
- 20 Huber I, Spangaard K, Appel K, Rossen L, Nielsen T, Gram L (2004) Phylogenetic
21 analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout
22 (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology 96: 117-132.
- 23 Irianto A, Austin B (2002) Probiotics in Aquaculture. Journal of Fishes Diseases 25:
24 633-642.
- 25 Kubtiza F, Campos J, Ono E, Istchuk P (2012a) Panorama da piscicultura no Brasil –
26 Parte I: estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da
27 atividade. Panorama da Aquicultura 22 (132): 14-25.

- 1 Kubtiza F, Campos J, Ono E, Istchuk P (2012b) Panorama da piscicultura no Brasil –
2 Parte II: particularidades regionais da piscicultura. Panorama da Aquicultura 22 (133):
3 16-31.
- 4 Merrifield D, Dimitroglou A, Foey A, Davies J, Baker R, Bøgwald J, Castex M, Ringø
5 E (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for
6 salmonids. Aquaculture 302: 1-18.
- 7 Moriarty D (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151:
8 333-349.
- 9 Moriarty D (1999) Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria.
10 Microbial Biosystems: New frontiers – Proceedings of the 8th International Symposium
11 on Microbial Ecology. In Bell, C. R.; Brylinsky, M. & Johnson-Green, P. (eds.).
12 Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- 13 Nayak S, Mukherjee S (2011) Screening of gastrointestinal bacteria of Indian major
14 carps for a candidate probiotic species for aquaculture practices. Aquac. Res. 42: 1034-
15 1041.
- 16 Panigrahi A, Azad I (2007) Microbial intervention for better fish health in aquaculture:
17 the Indian scenario. Fish Physiology and Biochemistry 33: 429-440.
- 18 Paungfoo C, Prasertsan C, Burrell P (2007) Nitrifying bacterial communities in an
19 aquaculture wastewater treatment system using fluorescence in situ hybridization
20 (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis. Biotechnology and
21 Bioengineering 97: 985–990.
- 22 Payne M, Hall M, Sly L, Bourne D (2007) Microbial diversity within early-stage
23 cultured *Panulirus ornatus* Phyllosomas. Applied and Environmental Microbiology 73:
24 1940-1951.
- 25 Pereira C, Salvador S, Arrojado C, Silva Y, Santos A, Cunha A, Gomes N, Almeida A
26 (2011) Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish
27 aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy. Journal of
28 Environmental Monitoring 13: 1053-1058.

- 1 Qi Z, Zhang X-H, Boon N, Bossier P (2009) Probiotics in aquaculture of China –
2 current state, problems and prospect. Aquaculture 290: 15-21.
- 3 Queiroz J, Kitamura P, Lourenço J, Castagnolli N, Cyrino J, Scorvo-Filho J, Bernardino
4 G, Valenti W (2002) A EMBRAPA e a Aqüicultura: Demandas e Prioridades de
5 Pesquisa. Brasília, DF, 35p.
- 6 Ridha M, Azad I (2012) Preliminary evaluation of growth performance and immune
7 response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative
8 probiotic bacteria. Aquac. Res. 43: 843-852.
- 9 Soto E, Hawke J, Fernandez D, Morales J (2009) *Franciella* sp., an emerging pathogen
10 of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. Journal of Fish Diseases 32: 713-
11 722.
- 12 Sun Y-Z, Yang H-L, Ma R-L, Song K, Lin W-Y (2011) Molecular analysis of
13 autochthonous microbiota along the digestive tract of juvenile grouper *Epinephelus*
14 *coioides* following probiotic *Bacillus pumilus* administration. Journal of Applied
15 Microbiology 110: 1093-1103.
- 16 Temmerman R, Huys G, Swings J (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-
17 dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science and Technology
18 15: 348-359.
- 19 Tiago G, GIANESELLA S (2003) O uso da água pela aquicultura: estratégias de
20 implementação de gestão. B. Inst. Pesca 29: 1-7.
- 21 Wang Y-B, Li J-R, Lin J (2008) Probiotics in aquaculture: challenges and outlook.
22 Aquaculture 281: 1-4.
- 23 Wicks B, Joesen R, Tang Q, Randall D (2002) Swimming and ammonia toxicity in
24 salmonids: the effect of sub lethal ammonia exposure on the swimming performance of
25 coho salmon and the acute toxicity of ammonium in swimming and resting rainbow
26 trout. Aquatic Toxicology 59: 55-69.
- 27 Zwirglmaier K (2005) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) – The next generation.
28 FEMS Microbiology Letters 246: 151-158.
- 29

Capítulo 1

Resumo em Português do Manuscrito Submetido à

Aquaculture Research

Comunidade Bacteriana da água e sedimento de viveiros e do trato intestinal de juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*) caracterizada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente.

Bacterial Community of Pond's Water, Sediment and in the Guts of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles Characterized by Fluorescent *In Situ* Hybridization Technique

Alessandro Del'Duca, Dionéia Evangelista Cesar e Paulo César Abreu

Manuscrito submetido à *Aquaculture Research*

Primeira Submissão: 11/06/2012

21 Submissão da 1^a Revisão: 15/02/2013

22 Submissão da 2^a Revisão: 02/05/2013

23 Aceito em: 10/05/2013

1 **Resumo**

2 Informações sobre a estrutura e funcionamento da comunidade bacteriana em viveiros
3 de piscicultura ainda são escassos, principalmente devido às dificuldades metodológicas
4 na contagem e identificação de bactérias não cultivadas. O principal objetivo deste
5 estudo foi avaliar o grau de similaridade entre a comunidade bacteriana do trato
6 digestivo de juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e as da água e do sedimento do
7 viveiro de produção, utilizando a técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH).
8 As amostras de água, de sedimento e do intestino de 30 juvenis de tilápias de um único
9 viveiro foram coletadas em janeiro de 2010. As bactérias potencialmente probióticas
10 *Bacillus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*,
11 *Lactobacillus farciminis*, e patogênicas *Vibrio* e *Pseudomonas fluorescens* foram
12 analisadas nas diferentes amostras utilizando-se sondas fluorescentes específicas para
13 cada espécie ou gênero. A similaridade da comunidade bacteriana entre os ambientes e
14 trato gastrointestinal dos peixes foi determinada pelo índice de Morisita-Horn. O trato
15 intestinal dos peixes apresentaram maiores abundâncias de *Pseudomonas fluorescens*,
16 *Bacillus*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus collinoides*. A composição da
17 comunidade bacteriana do trato gastrointestinal da tilápia foi mais similar com a da
18 água, do que aquela presente no sedimento do viveiro. Os resultados deste estudo
19 mostraram que a técnica de FISH pode ser facilmente utilizada para o monitoramento de
20 probióticos e detecção de patógenos em sistemas de aquacultura.

21

22 **Obs.: Manuscrito Original Aceito no ANEXO 1.**

23

1

Capítulo 2

2

Resumo em Português do Manuscrito Submetido à *Aquaculture*

3

4

5

6

7 **Avaliação da presença e eficiência de potenciais bactérias probióticas no intestino**
8 **de tilápias (*Oreochromis niloticus*) utilizando a técnica de hibridização *in situ***
9 **fluorescente**

10 **Evaluation of the Presence and Efficiency of Potential Probiotic Bacteria in the**
11 **Gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using the Fluorescent *In Situ* Hybridization**
12 **Technique**

13 **Alessandro Del'Duca, Dionéia Evangelista Cesar, Cláudio Galuppo Diniz e**
14 **Paulo César Abreu**

15

16

17

18 **Manuscrito formatado e submetido à *Aquaculture***

19 **Primeira Submissão: 08/01/2013**

20 **Submissão da Revisão: 15/01/2013**

21 **Artigo Aceito em: 16/01/2013**

22

1 **Resumo**

2 A técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) foi utilizada para quantificar
3 bactérias potencialmente probióticas e patogênicas no intestino de juvenis de tilápias
4 (*Oreochromis niloticus*). As bactérias potencialmente probióticas utilizadas neste estudo
5 foram isoladas da água, do sedimento e dos intestinos de tilápias (*Oreochromis*
6 *niloticus*) criadas em um sistema de aquicultura. Estes isolados foram testados em
7 experimentos *in vitro* de antagonismo contra bactérias potencialmente patogênicas
8 (*Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas*
9 *fluorescens* e *Pseudomonas putida*), também isoladas do mesmo sistema. Os dois
10 isolados que inibiram o maior número de bactérias patogênicas foram identificadas por
11 sequenciamento como *Bacillus* sp. e *Enterococcus* sp. e foram adicionados à ração
12 comercial (10^6 células. g⁻¹) para os testes *in vivo*. Os tratamentos deste experimento
13 foram: 1) Controle - peixes alimentados com ração; 2) Bacil. - peixes alimentados com
14 ração com adição de *Bacillus* sp. à ração; 3) Enter. - peixes alimentados com ração com
15 adição de *Enterococcus* sp. à ração; e 4) Bacil. + Enter. - peixes alimentados com ração
16 com adição de *Bacillus* sp. e *Enterococcus* sp. (1:1). Cada tratamento teve quatro
17 repetições com 15 juvenis de tilápia cada tanque (*Oreochromis niloticus* - $16,74 \pm 4,35$
18 g e $9,82 \pm 0,85$ cm). O experimento durou 30 dias e no final desse período, três peixes
19 de cada tanque foram mortos e os intestinos foram retirados para análise microbiológica
20 pela técnica FISH, com sondas para marcação e quantificação de *Bacillus* e
21 *Enterococcus*, bem como de duas bactérias potencialmente patogênicas (*Aeromonas* e
22 *Pseudomonas* sp.). *Enterococcus* sp. e *Bacillus* sp. estavam presentes em número
23 elevado na microbiota intestinal dos peixes. No entanto, *Bacillus* sp. mostrou um
24 aumento da abundância, indicando uma incorporação bem sucedida desta bactéria
25 potencial probiótica na microbiota intestinal das tilápias. Além disso, no tratamento
26 Bacil., observou-se uma redução significativa da abundância de *Aeromonas* e
27 *Pseudomonas* sp. em comparação aos outros tratamentos. Estes resultados indicam que
28 a técnica de FISH é uma importante ferramenta para caracterizar a dinâmica das
29 bactérias potencialmente probióticas e sua eficiência no controle das bactérias
30 patogênicas.

31 **Obs.: Manuscrito Original Aceito no ANEXO 2.**

Capítulo 3

2
3
4
5
6
7 **Uso da técnica de hibridização *in situ* fluorescente para caracterização da**
8 **comunidade bacteriana nitrificante na coluna de água e no biofilme de um sistema**
9 **de recirculação de água de produção de tilápis (*Oreochromis niloticus*)**

10
11 **Alessandro Del'Duca, Dionéia Evangelista Cesar, Thiago Archangelo Freato,**
12 **Raiza Azevedo e Paulo César Abreu**

13
14
15
16
17
18
19
20 **Manuscrito em preparação para submissão à revista *Aquaculture Environment***
21 ***Interactions***

22

6

7 Alessandro Del'Duca^{1*}, Dionéia Evangelista Cesar², Thiago Archangelo Freato³, Raíza
8 Azevedo² e Paulo César Abreu⁴

9

¹ Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Instituto de Oceanografia. Universidade Federal de Rio Grande – FURG. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, Código Postal 96201-900; alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br

¹³ ² Departamento de Biologia. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. Juiz de Fora,
¹⁴ Minas Gerais, Brasil, Código Postal 36036-900; dioneia.cesar@ufjf.edu.br

³ Fazenda Experimental de Leopoldina, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG. Leopoldina, Minas Gerais, Brasil.

¹⁷ ⁴ Instituto de Oceanografia. Universidade Federal de Rio Grande – FURG. Rio Grande,
¹⁸ Rio Grande do Sul, Brasil, Código Postal 96201-900; docpca@furg.br

19

1 **RESUMO**

2 Os sistemas de recirculação de água em aquacultura (RAS) são importantes para
3 diminuir a renovação necessária para a manutenção da qualidade da água e evitar
4 descarte de efluentes ricos em nutrientes em corpos de água receptores. O eficiente
5 funcionamento destes sistemas está relacionado ao estabelecimento da comunidade
6 bacteriana nitrificante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade
7 bacteriana nitrificante no biofilme e na água de um RAS para produção de tilápia
8 (*Oreochromis niloticus*). Amostras de biofilme e de água foram coletadas
9 periodicamente durante 30 dias e submetidas à técnica de Hibridização *In Situ*
10 Fluorescente (FISH) para identificar e quantificar grupos bacterianos responsáveis pela
11 nitrificação. Com a mesma periodicidade, os compostos nitrogenados foram medidos. A
12 amônia apresentou maior valor na primeira semana, enquanto o maior valor de nitrito
13 foi registrado na segunda semana. Já o nitrato foi aumentando ao longo do período
14 amostrado. A abundância bacteriana total no biofilme foi aumentando com o passar do
15 tempo, enquanto na água manteve-se semelhante neste período. Da mesma forma, as
16 abundâncias dos grupos nitrificantes foram aumentando no biofilme até o dia 10. Na
17 água, as abundâncias destes grupos apresentaram variações menores comparados ao
18 biofilme. As porcentagens dos grupos nitrificantes no biofilme diminuiu com o passar o
19 tempo, enquanto na água, apesar de algumas variações, as porcentagens destes grupos
20 foram semelhantes ao longo dos 30 dias. O rápido processo de nitrificação neste RAS
21 provavelmente está ligado ao incremento das bactérias nitrificantes no biofilme. Isso
22 porque a maior variação da comunidade bacteriana no biofilme indica que a atividade
23 das bactérias nitrificantes aderidas ao biofilme é mais intensa do que na água.

24

1 INTRODUÇÃO

2 Nos sistemas de produção, a remoção dos compostos nitrogenados como amônio
3 e nitrito é importante para o sucesso da produção de organismos aquáticos, uma vez que
4 estes elementos são tóxicos para peixes e crustáceos. Além da renovação de água, a
5 remoção destes compostos nitrogenados é possível pela ação de bactérias heterotróficas
6 e autotróficas, que atuam em processos diferentes. Bactérias heterotróficas incorporam a
7 amônia em sua biomassa na forma de proteína, enquanto que bactérias autotróficas
8 nitrificantes fazem a transformação do nitrogênio amoniacal em nitrato, com produção
9 temporária de nitrito (Ebeling et al., 2006). A nitrificação é um processo sequencial de
10 duas etapas de oxidação mediado por grupos bacterianos distintos (Hargreaves, 1998).
11 As bactérias oxidadoras de amônia (AOB) são os micro-organismos que oxidam a
12 amônia a nitrito, enquanto as bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) transformam o
13 nitrito a nitrato (Ebeling et al., 2006).

14 Os sistemas de recirculação de água na aquacultura (RAS) são uma alternativa
15 para diminuir a reposição de água para a manutenção da qualidade da água, além de não
16 produzirem efluentes ricos em nutrientes, que são normalmente despejados diretamente
17 no ambiente, aumentando a eutrofização dos corpos de água receptores (Ebeling e
18 Timmons, 2012). Nos sistemas de recirculação, a água utilizada tem renovação baixa ou
19 nula (Shnel et al., 2002) e o descarte ao final do ciclo produtivo tem menores
20 concentrações de nutrientes potencialmente tóxicos (Piedrahita, 2003). Estes sistemas se
21 baseiam no estabelecimento de comunidades nitrificantes aderidas a superfícies
22 compondo os biofiltros.

23 As bactérias aderidas ao biofilme e as que estão livres na água podem apresentar
24 diferenças fisiológicas, metabólicas e de expressão gênica (Becker et al., 2001; Anésio
25 et al., 2003; Moreno-Paz et al., 2010; Gao et al., 2012). Algumas espécies têm papéis
26 distintos na ciclagem dos nutrientes, participando de etapas específicas, enquanto outras
27 podem participar de mais de uma etapa (Schreier et al., 2010).

28 O maior conhecimento sobre a estrutura da comunidade microbiana nitrificante
29 tanto livre na água, como aderida ao biofilme que se forma nos sistemas de recirculação
30 é de fundamental importância para a melhoria da eficiência deste sistema (Read et al.,

1 2011). A utilização de técnicas moleculares para caracterizar a colonização e sucessão
2 nos ambientes aquícolas poderá contribuir para um melhor entendimento destes
3 processos de nitrificação, levando a um melhor manejo destas dos sistemas de produção
4 de organismos aquáticos (Michaud et al., 2006).

5 O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade
6 bacteriana no biofilme e na água e sua relação com os componentes nitrogenados de um
7 RAS. Para isso, foram avaliados pela técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente
8 (“Fluorescent *In Situ* Hybridization” - FISH) grupos bacterianos responsáveis pelo
9 processo de nitrificação (bactérias oxidadoras de amônia – AOB – e bactérias
10 oxidadoras de nitrito – NOB) presentes na água e no biofilme de um sistema de
11 recirculação de água utilizado na produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*).
12

13 MATERIAL E MÉTODOS

14 ***Sistema de Recirculação:***

15 O experimento foi desenvolvido durante 30 dias em um sistema de recirculação
16 de água (RAS) para produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) na Fazenda
17 Experimental de Leopoldina da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
18 (FELP/EPAMIG) entre 25 de janeiro e 24 de fevereiro de 2011.

19 O sistema consiste em 21 tanques (polietileno 1,000 L) de produção de peixes e
20 seis tanques do biorreator. Todos os tanques de produção e do RAS estavam
21 interligados e o fluxo de água foi estimado em aproximadamente 2,8 L por minuto.

22 Os tanques de produção foram estocados com 240 juvenis ($16,7 \pm 4,3$ g e $9,8 \pm$
23 0,9 cm) de tilápias, divididos em quatro tratamentos com diferentes rações (Del'Duca et
24 al., 2013). Estes peixes foram alimentados três vezes ao dia.

25 Dentre os seis tanques que formavam o biorreator, em dois (Tanque
26 Heterotrófico 1 e Tanque Heterotrófico 2) foram colocados cerca de 28 m^2 (em cada um
27 destes tanques) de rede de polietileno em três camadas para aumentar a superfície de
28 fixação do biofilme. Estes tanques foram monitorados neste estudo.

1 ***Amostragens:***

2 Avaliação temporal das bactérias do biofilme e da água foi realizada nos tanques
3 Heterotrófico 1 e 2 do RAS pela técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH).
4 Para isso, três amostras de rede (4 cm x 4 cm) e amostras de água destes dois tanques
5 foram coletadas a cada dois dias nas duas primeiras semanas e a cada quatro dias nas
6 duas semanas posteriores. Com a mesma periodicidade, amostras de água foram
7 coletadas para medir as concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato,
8 segundo o protocolo de Wetzel e Likens (1991).

9

10 ***Processamento das amostras de biofilme da rede e da água e análise bacteriana por***
11 ***FISH:***

12 As amostras de rede e de água foram fixadas com paraformaldeído concentração
13 final 2% e mantidas na geladeira por 24 horas. As amostras de rede dos foram tratadas
14 como descrito no protocolo de Epstein e Rossel (1995) com algumas modificações.
15 Antes de serem filtradas, estas amostras de rede foram pesadas e sonificadas (Vibra Cell
16 VCX 130PB, Sonics & Materials®) com amplitude de 110.7 µm por 60s (três vezes).
17 Após a sonificação, as amostras foram centrifugadas a 500 g por cinco minutos e o
18 sobrenadante retirado. Esta etapa foi repetida mais duas vezes com adição de água
19 ultrapura para lavagem do conteúdo. As três frações de sobrenadante foram colocadas
20 em um mesmo frasco, novamente centrifugadas e só então filtradas em filtros brancos
21 de policarbonato poro 0,2 µm e mantidos refrigerados a 4º C até a realização do
22 processo de hibridização. As amostras de água foram filtradas diretamente, após as 24
23 horas iniciais de fixação, em filtros brancos de policarbonato poro 0,2 µm.

24 Posteriormente, as amostras foram avaliadas por microscopia de
25 epifluorescência após tratamento pelo protocolo de FISH (Cottrell e Kirchman, 2003),
26 utilizando sondas de oligonucleotídeos para identificar e quantificar bactérias
27 oxidadoras de amônia (AOB β-proteobacteria) e bactérias oxidadoras de nitrito
28 (*Nitrobacter* e *Nitrospira* – filo) (Tabela 1). Todas as sondas foram marcadas com
29 fluorocromo Cy3. A abundância de bactérias foi obtida pela contagem direta com

1 aumento de 1000x utilizando um microscópio de epifluorescência (Olympus® BX-60)
2 equipado com os filtros: Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 e U-MWG2.

3

4 Tabela 1. Sondas de oligonucleotídeos para identificação de diferentes grupos bacterianos usados neste
5 trabalho. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3.

Sonda	Especificidade	Sequencia (5' - 3')	% FA*	Referência
NON	Controle Negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	Yokokawa and Nagata 2005
Nso 1225	AOB β -proteobacteria	CGCCATTGTATTACGTGTGA	35	Mobarry et al 1996
NIT3	<i>Nitrobacter</i>	CCTGTGCTCCATGCTCC	40	Wagner et al 1996
Ntspa712	Filo Nitrospira	CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC	50	Daims et al 2001

6 * Porcentagem de formamida (FA) na solução de hibridização *in situ*.

7

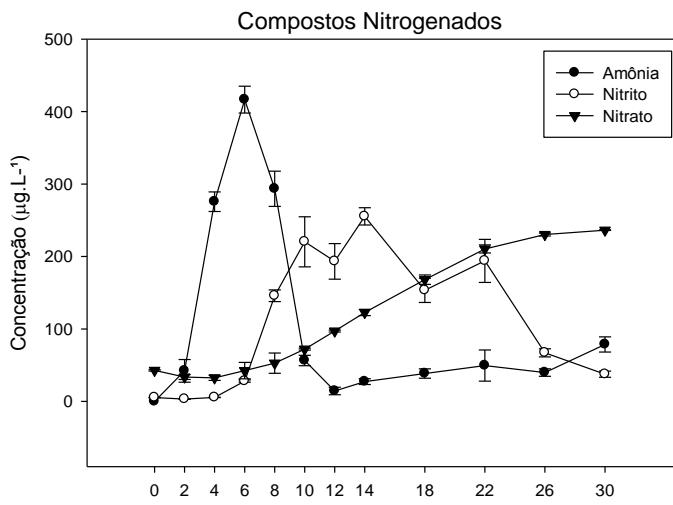
8 **Análises Estatísticas:**

9 Os dados foram testados quanto à sua normalidade. Para os dados normais, foi
10 utilizado os testes ANOVA (One-Way), seguido de *a posteriori* Tukey. Para os dados
11 não-normais, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. Em ambos os casos, foram
12 consideradas significativas diferenças com valor de $P < 0,05$. A correlação entre os
13 dados abióticos e bióticos foi determinada pela correlação de Pearson, sendo
14 considerada significativa para os valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram
15 realizadas com o auxílio do programa SigmaPlot 11.0 (Zar, 1999).

16

17 **RESULTADOS**

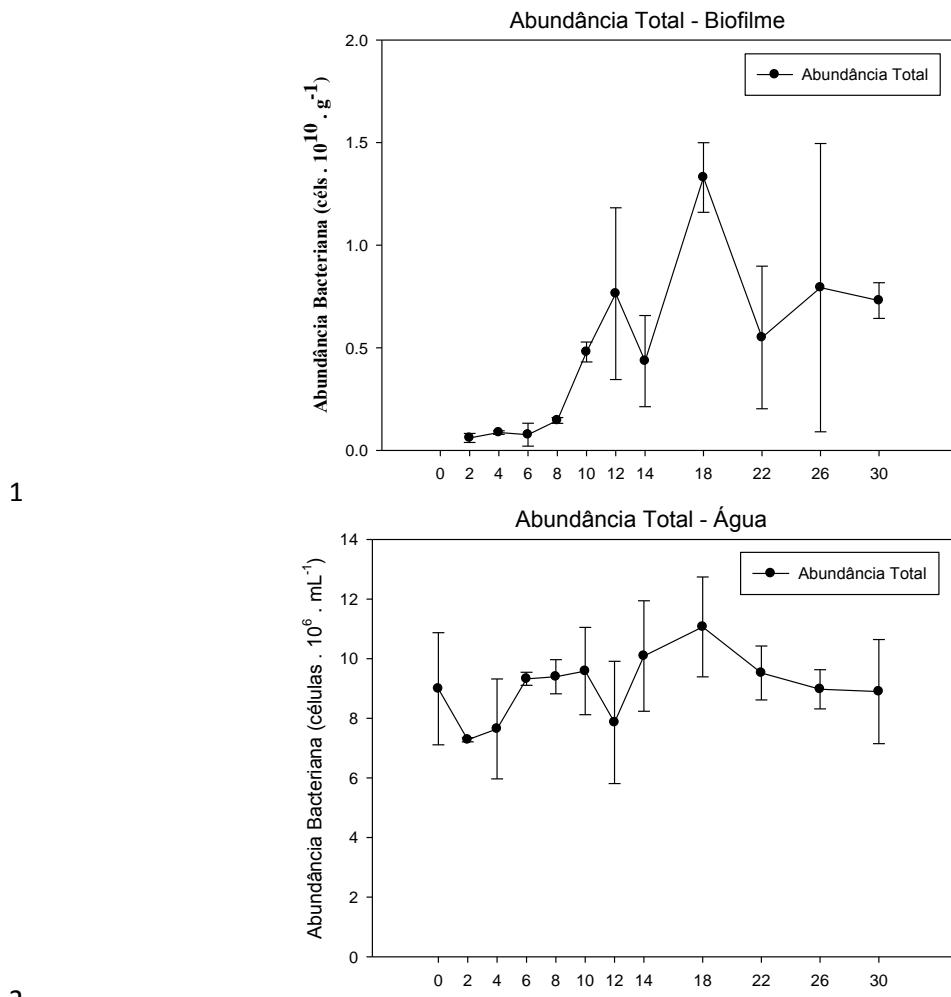
18 A maior concentração de nitrogênio amoniacal foi observada no sexto dia de
19 experimento, ocorrendo uma diminuição a partir de então. A concentração de nitrito
20 atingiu seu máximo na segunda semana de amostragem no RAS, enquanto que a
21 concentração de nitrato aumentou constantemente ao longo do tempo (Fig. 1).



1

2 Fig. 1. Média das concentração média de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) na água nos
3 Tanques Heterotróficos 1 e 2 nos 30 dias de funcionamento do RAS.

4 A abundância bacteriana total no biofilme teve um incremento ao longo do
5 experimento. Os valores observados foram significativamente maiores a partir do dia 10
6 ($0,47 \text{ células} \cdot 10^{10} \cdot \text{g}^{-1}$), atingindo o máximo no dia 18. Enquanto que a abundância
7 bacteriana total na água, apesar de algumas variações, manteve-se mais estável, com
8 valor máximo também no dia 18 ($11,7 \text{ células} \cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) (Fig. 2).



6 As abundâncias específicas dos grupos bacterianos nitrificantes apresentaram
7 diferenças no biofilme e na água. As variações nas abundâncias no biofilme de AOB β -
8 proteobactérias foi de 0,27 a $1,80 \cdot 10^8$ células . g $^{-1}$; *Nitrobacter* variou de 0,06 a $1,16 \cdot 10^8$ células . g $^{-1}$ e *Nitrospira* oscilou entre 0,04 a $0,61 \cdot 10^8$ células . g $^{-1}$. Apesar de uma
9 diminuição da abundância de AOB β -proteobactérias entre os dias 2 e 4, as abundâncias
10 dos três grupos bacterianos analisados (AOB β -proteobactérias, *Nitrobacter* e
11 *Nitrospira*) foram aumentando no biofilme até o dia 10. Posteriormente, observou-se
12 uma queda no dia 12, seguida de um novo incremento, principalmente para as AOB. Ao
13 final dos 30 dias, todos estes grupos apresentavam abundâncias semelhantes no
14 biofilme. Na água, as abundâncias dos grupos tiveram uma variação menor do que no
15 biofilme. Na água, as abundâncias dos grupos tiveram uma variação menor do que no

biofilme ao longo dos dias amostrados. As abundâncias dos três grupos apresentaram variações com incrementos e diminuições dos valores ocorrendo periodicamente. As variações das abundâncias na água de AOB β -proteobactérias foi de $0,46$ a $0,81 \cdot 10^6$ células . mL $^{-1}$; de *Nitrobacter* de $0,48$ a $0,73 \cdot 10^6$ células . mL $^{-1}$ e *Nitrospira* de $0,39$ a $0,75 \cdot 10^6$ células . mL $^{-1}$. Todos os grupos analisados apresentaram diminuição das abundâncias no período inicial (até dia 4), seguido de um incremento nas abundâncias destes grupos (Fig. 3).

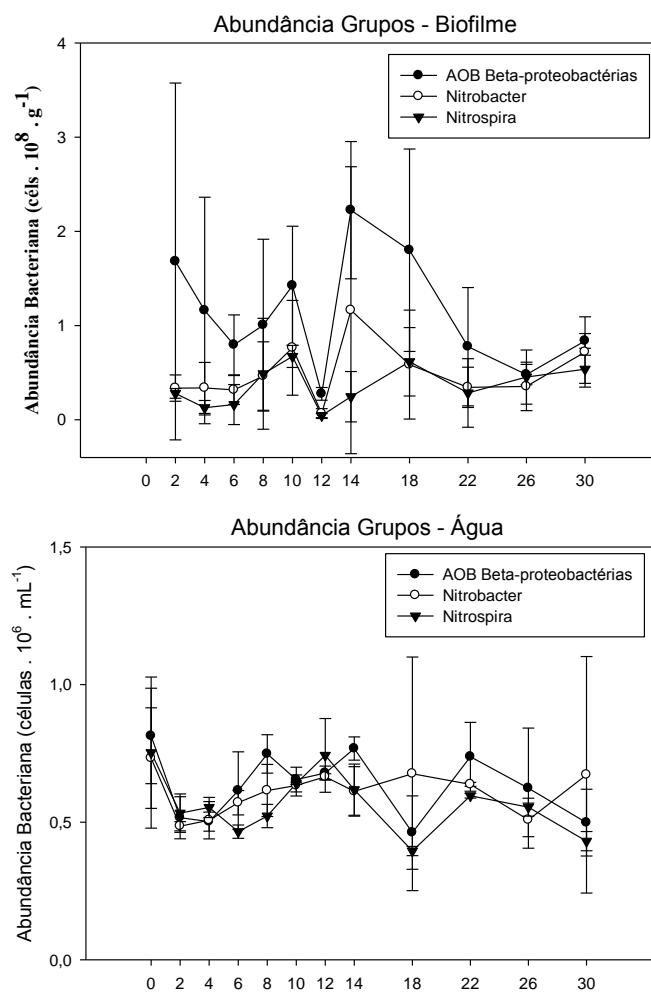
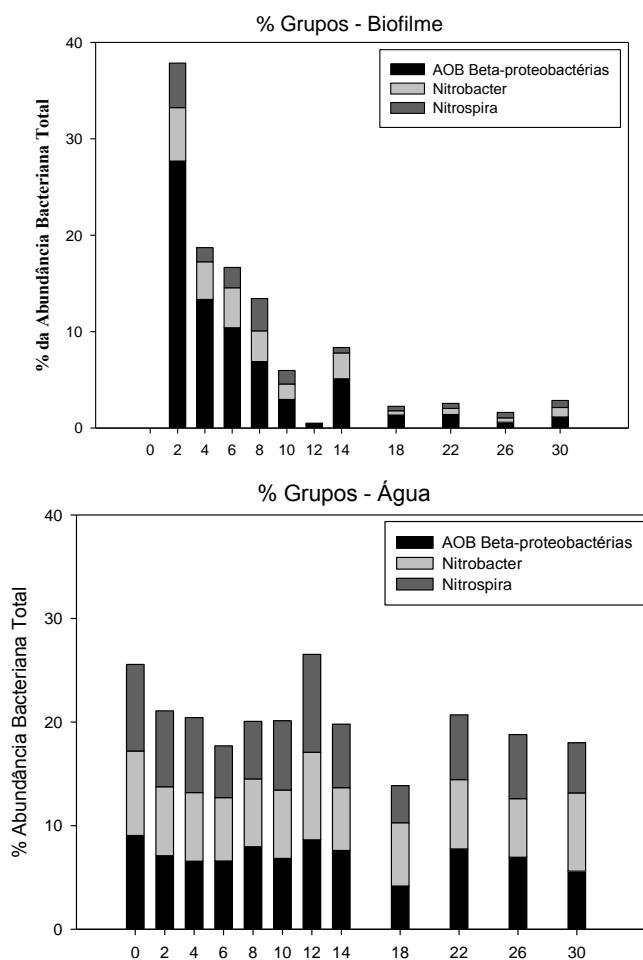


Fig. 3. Média da abundância bacteriana específica no biofilme da rede ($\text{células} \cdot 10^8 \cdot \text{g}^{-1}$) e na água ($\text{células} \cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) de AOB β -proteobactérias, *Nitrobacter* e *Nitrospira* nos Tanques Heterotróficos 1 e 2 durante o primeiro mês de funcionamento do RAS.

Em média, a porcentagem de grupos bacterianos identificados pelas sondas específicas de bactérias ligadas ao ciclo do Nitrogênio foi diminuindo com o passar o tempo no biofilme. Esta tendência é mais clara para o grupo AOB β -proteobactérias, que apresentou proporções maiores em relação à abundância bacteriana total na

primeira semana, mas as mesmas tendências também foram observadas para os dois grupos de NOB. O mesmo não foi observado na água, que, apesar de algumas variações nas proporções destes grupos, apresentou valores semelhantes das porcentagens em relação à abundância bacteriana total. A variação da proporção destes grupos no biofilme variou de 0,5% (dia 12) a 37,8% (dia 2). A partir da terceira semana de amostragem, as proporções não foram maiores que 3% da abundância bacteriana total no biofilme. As proporções destes mesmos grupos na água variaram menos ao longo do período amostrado. Esses valores variaram de 13,9% (dia 18) a 25,6% (primeiro dia). Em média, estes grupos representaram 20% da abundância bacteriana na água (Fig. 4).



10

11

12 Fig. 4. Média da porcentagem em relação à abundância bacteriana total de AOB β -proteobactérias,
13 *Nitrobacter* e *Nitrospira* no biofilme da rede e na água dos Tanques Heterotróficos 1 e 2 nos 30 dias de
14 funcionamento do RAS.

15

1 A abundância bacteriana total do biofilme teve correlação significativa negativa
2 com as concentrações de amônia (-0,622; $p = 0,0408$) e positiva com as concentrações
3 de nitrato (0,718; $p = 0,0128$). Na água, não foram observadas nenhuma correlação
4 significativa entre os compostos nitrogenados e os dados de bactérias.

5

6 DISCUSSÃO

7 Os elementos nitrogenados tóxicos como amônia e nitrito são oriundos,
8 principalmente, da decomposição de matéria orgânica proveniente da ração e da
9 excreção dos peixes que estão sendo produzidos (Piedratha, 2003). Altas concentrações
10 de amônia e de nitrito trazem grandes prejuízos ao crescimento dos peixes, podendo
11 levar à morte destes animais. A alta concentração de amônia na produção, por exemplo,
12 causa problemas no sistema nervoso central, no metabolismo energético, no equilíbrio
13 iônico e problemas morfológicos como fusão das lamelas das brânquias dos peixes
14 (Wicks et al., 2002). Já o nitrito, quando presente em concentrações elevadas no
15 ambiente, leva à formação da metahemoglobina no sangue dos peixes. Isso faz com que
16 o transporte de oxigênio pelo sangue seja prejudicado, ou até mesmo inibido
17 completamente (Frances et al., 1998).

18 Para evitar que os compostos nitrogenados tóxicos se acumulem em altas
19 concentrações nos sistemas de aquacultura, geralmente dois métodos são utilizados. Um
20 é a renovação constante da água de produção e o outro é a utilização de biofiltros em
21 sistemas de recirculação de água (RAS), que apresentam comunidades de bactérias
22 nitrificantes que transformam a amônia em nitrito e este em nitrato, evitando os efeitos
23 tóxicos dos dois primeiros elementos.

24 O maior problema da renovação da água enriquecida com compostos
25 nitrogenados é o descarte constante deste efluente no corpo receptor, causando a
26 eutrofização do mesmo (Mugg et al., 2000). No caso do RAS, é importante o
27 estabelecimento das bactérias nitrificantes que, geralmente, têm crescimento lento e são
28 sensíveis a elevadas concentrações nutriente (como amônia, por exemplo). Entretanto,
29 quando estes sistemas estão completamente funcionais, a amônia e o nitrito são

1 oxidados a nitrato, que é menos tóxico aos animais (Hargreaves, 1998; Larsen et al.,
2 2008; Wagner e Loy, 2002; Kim et al., 2006).

3 A remoção dos compostos nitrogenados tóxicos está diretamente relacionada à
4 diversidade, número e papel funcional das bactérias presentes nos sistemas (Davey e
5 O'Toole, 2000). Conhecer as bactérias do sistema permite manipular a colonização
6 destes (Paungfoo et al., 2007), aumentando a eficiência da remoção dos compostos
7 nitrogenados. Assim, é importante acompanhar o desenvolvimento da comunidade
8 microbiana aderida ao biofilme para avaliar possíveis substituições de espécies e
9 mudanças na abundância de grupos específicos de interesse no biofiltro. A
10 caracterização microbiológica da água, por sua vez, permite conhecer quais grupos
11 bacterianos potencialmente podem se estabelecer no biofilme. Para isto, a quantificação
12 específica das bactérias deve ser realizada por metodologias precisas e rápidas (Schreier
13 et al., 2010) como, por exemplo, a técnica de FISH utilizada neste estudo.

14 O biofiltro do RAS estudado em nosso trabalho foi eficiente, reduzindo a
15 concentração dos compostos nitrogenados tóxicos, deixando as concentrações de
16 amônia e nitrito dentro dos limites aceitáveis para a produção de tilápias (*Oreochromis*
17 *niloticus*) (Timmons et al., 2002).

18 No período em que houve as maiores concentrações de amônia foi observado
19 também um incremento na abundância de AOB β-proteobactérias, principalmente no
20 biofilme. Outros estudos mostraram uma relação direta entre as concentrações de
21 amônia e a abundância e atividade das AOB (Burrel et al., 2002; Grommen et al., 2002).
22 Da mesma forma, também foi verificado em nosso estudo um incremento na abundância
23 dos grupos de NOB no biofilme no mesmo período em que o nitrito apresentou
24 concentrações mais altas. Bassin et al. (2012) mostram que o incremento das bactérias
25 nitrificantes (AOB e NOB) no biofilme ocorreu simultaneamente com o aumento das
26 concentrações dos compostos nitrogenados, indicando maior atividade nitrificante no
27 biofilme devido ao incremento na abundância destas bactérias. Por outro lado, as
28 abundâncias e proporções de AOB e NOB na água não tiveram grandes diferenças ao
29 longo do tempo.

1 A variação da composição da comunidade bacteriana no biofilme concomitante
2 com o incremento das concentrações dos elementos nitrogenados indica que a atividade
3 das bactérias nitrificantes aderidas ao biofilme é mais intensa, provavelmente devido ao
4 fato de que estas bactérias aderidas são as responsáveis pela nitrificação e não por
5 aquelas livres na água (Gieseke et al., 2003; Michaud et al., 2006). Além disso, a
6 abundância das bactérias nitrificantes aderidas ao biofilme foi, pelo menos, 100 vezes
7 maior do que na água pela unidade equivalente em peso. Maior abundância das
8 bactérias no biofilme em relação à água, como também foi observada em outros estudos
9 (Ramesh et al., 1999; Umesh et al., 1999). Asaduzzaman et al. (2009) e Aduelo-Naranjo
10 et al. (2012) também sugerem uma maior eficiência do RAS quando ocorre um aumento
11 da superfície para adesão das bactérias formadoras de biofilme. A aderência das
12 bactérias nitrificantes é importante para se ter maior eficiência da nitrificação (Larsen et
13 al., 2008; Bassin et al., 2012).

14 Outros estudos também mostraram que a comunidade bacteriana nitrificante
15 aderida ao biofilme é capaz de realizar completamente o processo de nitrificação,
16 mesmo que não houvesse atividade das bactérias da água (Holl et al., 2011a). Por outro
17 lado, Oliveira et al. (2006) encontraram uma interação direta entre as bactérias da água
18 e do biofilme, mostrando que o incremento de alguns grupos de bactérias nitrificantes
19 no biofilme acontece após à diminuição da abundância destes grupos na água. Em nosso
20 caso, é possível que a abundância relativamente constante das bactérias nitrificantes na
21 água, com valores altos desde o início do experimento, tenha sido importante para a
22 colonização e formação do biofilme neste RAS. Assim, é possível que a água sirva
23 como o veículo disseminador das bactérias até o substrato (redes de polietileno
24 colocadas nos tanques), mas não como o principal ambiente de nitrificação.

25 Existem diferenças no tempo para o estabelecimento do processo de nitrificação
26 comparando-se diferentes sistemas. Essas diferenças na remoção dos compostos
27 nitrogenados tóxicos são dependentes do tipo de sistema, da intensidade de produção
28 dos compostos (Azim e Little, 2008) e da estrutura e atividade da comunidade
29 microbiana (Holl et al., 2011b). Diferentes grupos bacterianos têm estratégias de
30 crescimento distintas. As bactérias têm taxas de crescimento específicas, que podemos
31 diferenciar em bactérias com estratégia de crescimento mais lento (estratégia do tipo K)

1 daquelas com crescimento mais rápido (estratégia do tipo r) (Kristufek et al., 2005). Isso
2 pode fazer com que as taxas de transformação dos compostos nitrogenados sejam
3 diferentes devido à diferença no tempo de estabelecimento e atividade destas bactérias
4 no sistema.

5 Para que as bactérias nitrificantes, que em sua maioria apresentam taxas de
6 crescimento lento (K estrategistas), se estabeleçam nos sistemas de recirculação, é
7 importante o fornecimento de substratos para fixação (Delatolla et al., 2009; Vlaeminck
8 et al., 2010; Bassin et al., 2012). A entrada dos compostos nitrogenados pode variar em
9 relação à qualidade da ração utilizada e da espécie produzida. Dependendo da espécie
10 produzida, os animais podem assimilar menor quantidade de nutrientes e/ou excretar
11 maior quantidade de amônia para o meio, aumentando a concentração no ambiente de
12 produção, como constatado para espécies diferentes de camarão produzidos em sistemas
13 de biofoco, outro tipo de sistema de circulação fechada (Silva et al., 2013). Desta
14 forma, o incremento da abundância bacteriana no biofilme pode estar relacionado às
15 maiores concentrações de amônia na água (Burrel et al., 2002; Grommen et al., 2002;
16 Bassin et al., 2012), que favorece principalmente o crescimento das AOB na primeira
17 semana de experimento. Em geral, pode-se dizer que, em nosso estudo, o processo de
18 nitrificação no RAS foi acelerado, provavelmente devido ao rápido incremento da
19 abundância das bactérias nitrificantes no biofilme. Além disso, a maior disponibilidade
20 de substrato com a colocação das redes nos tanques para o crescimento das bactérias
21 aderidas parece ter favorecido o processo de nitrificação.

22 A menor proporção dos grupos nitrificantes observada ao final do experimento
23 no biofilme mostra que outros grupos bacterianos começaram a crescer no biofilme.
24 Mesmo assim, percebemos que o processo de nitrificação permaneceu eficiente, pois
25 não foram observados novos incrementos de amônia ou nitrito. As bactérias
26 heterotróficas também são importantes para a remoção da amônia em RAS (Ebeling et
27 al., 2006). Entretanto, competições entre as heterotróficas e as nitrificantes podem
28 acontecer por oxigênio, por espaço (Ebeling et al., 2006; Blancheton et al., 2013), ou
29 mesmo por nutrientes (difícil difusão para camadas mais profundas do biofilme), o que
30 poderia gerar uma menor eficiência do RAS.

1 A técnica de FISH foi importante para constatarmos todas essas variações dos
2 grupos identificados ao longo do tempo. Isso porque ela nos permitiu quantificar os
3 grupos na água e no biofilme, inferindo a relação destes grupos com os compostos
4 nitrogenados. Entretanto, deve-se considerar que as sondas utilizadas não marcaram a
5 maioria das espécies de bactérias nitrificantes. De maneira geral, as sondas utilizadas
6 em nosso trabalho identificaram grandes grupos de diferentes espécies de bactérias
7 nitrificantes, não havendo grande capacidade de resolução e, podendo também não ter
8 identificado bactérias nitrificantes de outros gêneros diferentes das sondas utilizadas.
9 Larsen et al. (2008) encontraram que a maior parte dos agregados microbianos
10 estudados por eles era formado por bactérias com sondas já descritas na literatura. Ao
11 contrário, Burrel et al. (2002) mostraram que, apesar de 50% das bactérias do biofilme
12 ser compostos por AOB, poucas destas eram identificadas por primers ou sondas já
13 descritas na literatura anteriormente. Mesmo assim, nos dois trabalhos, a nitrificação foi
14 observada. Comunidades diferentes e diversas de AOB e de NOB coexistem nos
15 biofilmes e atuam em conjunto (Gieseke et al., 2003), podendo variar quanto ao tempo
16 da atividade que está relacionada à taxa de crescimento dos diferentes grupos
17 bacterianos.

18 Nossos dados mostram que as bactérias nitrificantes do biofilme tiveram maior
19 importância no processo de nitrificação e, consequentemente, no funcionamento do
20 biofiltro do RAS. Assim, caracterizar a comunidade bacteriana nitrificante no biofilme e
21 entender como a aderência destas bactérias nos substratos ocorre são importantes para
22 otimizar este importante processo nos RAS (Chen et al., 2006; Larsen et al., 2008;
23 Delattola et al. 2009).

24

25 **Agradecimentos**

26 Agradecemos a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)
27 pelo apoio logístico na Fazenda Experimental de Leopoldina (FELP/EPAMIG).
28 Agradecemos Edmo Montes pelo auxílio no processamento das amostras para análise de
29 FISH e na medida dos nutrientes; Dr. Luiz Cláudio Ribeiro (Departamento de

1 Estatística, UFJF, Brasil) pelo auxílio nas análises estatísticas. Suporte financeiro e
2 consentimento de bolsa pelo CNPq (Processo 145337/2009-0).

3

4 **REFERÊNCIAS**

5 Aduelo-Naranjo J, Voltolina D, Romero-Beltrán E (2012) Culture of white shrimp
6 (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) with zero water exchange and no food addition:
7 an eco-friendly approach. Lat Am J Aquat Res 40: 441-447

8 Anesio A, Abreu P, Biddanda B (2003) The role of free and attached microorganisms in
9 the decomposition of estuarine macrophyte detritus. Estuarine, Coastal and Shelf
10 Science 56: 197-201.

11 Asaduzzaman M, Wahab M, Verdegem M, Benerjee S, Akter T, Hasan M, Azim M
12 (2009) Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton
13 developments on pond ecology and production in C/N-controled freshwater prawn
14 *Macrobrachium rosenbergii* farming systems. Aquaculture 287: 371-380.

15 Azim M, Little D (2008) The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality,
16 biofloc composition and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
17 Aquaculture 283: 29-35.

18 Bassin J, Kleerebezem R, Rosado A, van Loosdrecht M, Dezotti M (2012) Effect of
19 different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying
20 microbial population in moving-bed biofilm reactors. Enviromental Science &
21 Technology 46: 1546-1555.

22 Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herssmann M (2001) Detection of differential gene
23 expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Saphylococcus aureus*
24 using micro-representational-deference analysis. Appl Environ Microb 67: 2958-2965.

25 Blancheton J, Attramadal K, Michaud L, d'Orbcastel E, Vadstein O (2013) Insight into
26 bacterial population in aquaculture systems and its implication. Aquacult Eng 53: 30-39.

- 1 Brown M, Briones A, Diana J, Raskin L (2013) Ammonia-oxidizing archaea and nitrite-
2 oxidizing nitrospiras in the biofilters of a shrimp recirculating aquaculture system.
3 FEMS Microbiology Ecology 83: 17-25.
- 4 Burrel P, Phalen C, Hovanec T (2002) Identification of bacteria responsible for
5 ammonia oxidation in freshwater aquaria. Appl Environ Microb 67: 5791-5800.
- 6 Chen S, Ling J, Blancheton J-P (2006) Nitrification kinetics of biofilm as affected by
7 water quality factors. Aquacultural Engineering 34: 179-197.
- 8 Cottrell M, Kirchman D (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial
9 biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary.
10 Limnol Oceanogr 48: 168-178.
- 11 Daims H, Nielsen J, Nielsen P, Schleifer K-H, Wagner M (2001) In situ characterization
12 of *Nitrosospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. Appl
13 Environ Microbiol 67: 5273-5284.
- 14 Davey M, O'Toole G (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.
15 Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 847-867.
- 16 Delatolla R, Tufenkji N, Comeau Y, Lamarre D, Gadbois A, Berk D (2009) In situ
17 characterization of nitrifying biofilm: minimizing biomass loss and preserving
18 perspective. Water Research 43: 1775-1787.
- 19 Del'Duca A, Cesar D, Diniz C, Abreu P (2013) Evaluation of the presence and
20 efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
21 using the fluorescent *in situ* hybridization. Aquaculture doi:
22 dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019
- 23 Ebeling J, Timmons M (2012) Recirculating Aquaculture Systems. In Aquaculture
24 Production Systems (ed. J. H. Tidwell), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
25 doi: 10.1002/9781118250105.ch11
- 26 Ebeling J, Timmons M, Bisogni J (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of
27 photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in
28 aquaculture systems. Aquaculture 257: 346-358.

- 1 Epstein S, Rossel J (1995) Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal
2 protocol. Marine Ecology Progress Series 117: 289-298.
- 3 Frances J, Allan G, Nowak B (1998) The effects of nitrite on the short-term growth of
4 silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture 163: 63-72.
- 5 Gao X-Y, Xu Y, Liu Y, Liu Y, Liu Z-P (2012) Bacterial diversity, community structure
6 and associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating
7 marine aquaculture system. Mar Biodiv 42: 1-11.
- 8 Gieseke A, Bjerrum L, Wagner M, Amann R (2003) Structure and activity of multiple
9 nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. Environ Microb 5: 355-369.
- 10 Grommen R, van Hauteghem I, van Wambeke M, Verstraete W (2002) An improved
11 nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria
12 systems. Aquaculture 211: 115-124.
- 13 Hargreaves J (1998) Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture 166:
14 181-212.
- 15 Holl C, Otoshi C, Unabia C (2011a) Nitrifying biofilms critical for water quality in
16 intensive shrimp RAS. Global Aquaculture Advocate 14: 38-39.
- 17 Holl C, Glazer C, Moss S (2011b) Nitrogen stable isotopes in recirculating aquaculture
18 for super-intensive shrimp: tracing the effects of water filtration on microbial nitrogen
19 cycling. Aquaculture 311: 146-154.
- 20 Kim D-J, Lee D-I, Keller J (2006) Effect of temperature and free ammonia on
21 nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying
22 bacterial community by FISH. Bioresource Technology 97: 459-468.
- 23 Kristufek V, Elhottová D, Chronáková A, Dostálková I, Picek T, Kalcík J (2005)
24 Growth strategy of heterotrophic bacterial population along successional sequence on
25 spoil of brown coal colliery substrate. Folia Microbiol 50: 427-435.

- 1 Kumar V, Joseph V, Vijai R, Philip R, Singh B (2011) Nitrification in a packed bed
2 bioreactor integrated into a marine recirculating maturation system under different
3 substrate concentrations and flows rates. J Chem Technol Biotechnol 86: 790-797.
- 4 Kumar V, Sukumaran V, Achuthan C, Joseph V, Philip R, Singh B (2013) Molecular
5 characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of
6 bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. International
7 Biodeterioration and Biodegradation 78: 74-81.
- 8 Larsen P, Nielsen J, Svendsen T, Nielsen P (2008) Adhesion characteristics of nitrifying
9 bacteria in activated sludge. Water Research 42: 2814-2826.
- 10 Michaud L, Blancheton J-P, Bruni V, Piedrahita R (2006) Effect of particulate organic
11 carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological
12 filters. Aquacultural Engineering 34: 224-233.
- 13 Mobarry B, Wagner M, Urbain V, Rittmann B, Stahl D (1996) Phylogenetic probes for
14 analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Appl Environ
15 Microbiol 62: 2156-2162.
- 16 Moreno-Paz M, Gómez M, Arcas A, Parro V (2010) Environmental transcriptome
17 analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life
18 of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in the natural microbial community.
19 BMC Genomics doi:10.1186/1471-2164-11-404.
- 20 Mugg J, Serrano A, Liberti A, Rice M (2000) Aquaculture effluents: a guide for water
21 quality regulators and aquaculturists. North Dartmouth, Massachusetts: University if
22 Massachussetts Dartmouth. NRCA Publication N. 00-003
23 (seagrant.uconn.edu/whatwedo/aquaculture/pdf/nrac00003_effluents.pdf)
- 24 Oliveira S, Wasielesky W, Ballester E, Abreu P (2006) Caracterização da assembleia
25 de nitrificantes pelo método “fluorescent *in situ* hybridization” (FISH) no biofilme e na
26 água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepeneaus paulensis*. Altântica 28: 33-45.
- 27 Paungfoo C, Prasertsan P, Burrell P, Intrasungkha N, Blackall L (2007) Nitrifying
28 bacterial communities in a aquaculture wastewater treatment system using fluorescent

- 1 *in situ* hhybridization (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis.
2 Biotechnology and Bioengineering 97: 985-990.
- 3 Piedrahita R (2003) Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture
4 effluents through intensification and recirculation. Aquaculture 226: 35-44.
- 5 Ramesh M, Shankar K, Mohan C, Varghese T (1999) Comparison of three plant
6 substrate for enhancing carp growth through bacterial biofilm. Aquacultural
7 Engineering 19: 119-131.
- 8 Read S, Marzorati M, Guimarães B, Boon N (2011) Microbial resource management
9 revisited: successful parameters and new concepts. Appl Microbiol Biotechnol 90:861-
10 871.
- 11 Schreier H, Mirzoyan N, Saito K (2010) Microbial diversity of biological filters
12 recirculating aquaculture systems. Curr Opin Microbiol 21: 318-325.
- 13 Shenel N, Barak Y, Ezer T, Dafni Z, van Rijn J (2002) Design and performance of a
14 zero-discharge tilapia recirculating system. Aquacultural Engineering 26: 191-203.
- 15 Silva K, Wasielesky Jr W, Abreu P (2013) Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the
16 Biofloc Production of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the
17 World Aquaculture Society 44: 30-41.
- 18 Timmons M, Ebeling J, Wheaton T, Summerfelt S, Vinci B (2002) Sistemas de
19 recirculacion para la acuicultura. Chile: Fundacion, 747 p.
- 20 Umesh N, Shankar K, Mohan C (1999) Enhancing growth of common carp, rohu and
21 Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm. Aquaculture
22 International 7: 251-260.
- 23 Vlaeminck S, Terada A, Smets B, Clippelier H, Schaubroeck T, Bolca S, Demeestere L,
24 Mast J, Boon N, Carballa M, Verstraete W (2010) Aggregate size and architecture
25 determine microbial activity balance for one-stage partial nitritation and anammox.
26 Appl Environ Microbiol 76: 900- 909.

- 1 Wagner M, Rath G, Koops H-P, Flood J, Amann R (1996) *In situ* analysis of nitrifying
2 bacteria in sewage treatment plants. Water Science and Technology 34: 237-244.
- 3 Wetzel R, Likens G (1991) Limnological Analysis. Springer.
- 4 Wicks B, Joesen R, Tang Q, Randall D (2002) Swimming and ammonia toxicity in
5 salmonids: the effect of sub lethal ammonia exposure on the swimming performance of
6 coho salmon and the acute toxicity of ammonium in swimming and resting rainbow
7 trout. Aquatic Toxicology 59: 55-69.
- 8 Yokokawa T, Nagata T (2005) Growth and grazing mortality rates of phylogenetic
9 groups of bacterioplankton in coastal marine environments. Applied and Environmental
10 Microbiology 71: 6799-6807.
- 11 Zar J (1999) Biostatistical Analysis. Prentice Hall Publisher. Upper Saddle River, USA.
- 12

1 DISCUSSÃO GERAL

2 *Bactérias no trato intestinal:*

3 As bactérias são importantes, sob diversos aspectos, para o funcionamento e
4 manutenção dos sistemas de aquacultura. Entender a interação da microbiota com os
5 animais que estão sendo produzidos é importante para elucidar os mecanismos de
6 manejo e controle de patogenias e/ou de compostos tóxicos (Nayak, 2010a;
7 Blancheton et al., 2013). Nas últimas décadas, os estudos da microbiota em peixes e
8 nos ambientes tentaram elucidar as diferentes funções e ações destes micro-organismos
9 (Nayak, 2010b) e, consequentemente, como aplicar este conhecimento para melhorar as
10 condições de produção de organismos aquáticos.

11 É consenso que a microbiota intestinal é de suma importância para a nutrição e
12 saúde dos animais criados. Mesmo assim, muitas ainda são as dúvidas em relação ao
13 estabelecimento da comunidade bacteriana no intestino bem como, a diversidade e
14 outros papéis que estes micro-organismos podem exercer (Nayak, 2010b).

15 Os peixes possuem uma complexa comunidade de micro-organismos em seus
16 intestinos, que podem ser classificadas como comensais, não patogênicas e patogênicas.
17 O equilíbrio desta comunidade microbiana é a chave para que não ocorram surtos de
18 doenças nos sistemas de produção. Essas bactérias são essenciais para a melhoria de
19 respostas imunológicas, como maior produção de imunoglobulinas, importantes na
20 proteção contra doenças. Os animais saudáveis têm sua microbiota comensal bem
21 estabelecida e a transitória com poucas bactérias patogênicas. Os distúrbios nesta
22 comunidade fazem com que as doenças apareçam, principalmente, a partir da ação das
23 bactérias transitórias (Nayak, 2010a e 2010b; Pérez et al., 2010).

24 Portanto, os micro-organismos intestinais são de suma importância para o
25 estabelecimento das doenças e para manutenção da saúde dos animais produzidos
26 (Wong e Rawls, 2012). Isso tanto do ponto de vista das infecções, já que o intestino é
27 uma das principais rotas para instalação das doenças, quanto para se obter bactérias
28 probióticas. Sugita et al. (1998) observaram que 2,7% da microbiota endêmica isolada
29 por eles tinha capacidade de controlar micro-organismos potencialmente patogênicos.

1 Por isso, estudar a microbiota dos animais produzidos e dos ambientes pode elucidar
2 várias linhagens potencialmente probióticas para ser usadas em aquacultura.

3 Como a microbiota influencia na digestão dos animais, é de se esperar que a
4 composição da comunidade bacteriana seja semelhante em animais com hábitos
5 alimentares semelhantes (Sullam et al., 2012). Isso deve ser levado em consideração
6 para se avaliar as variações e a manipulação da microbiota para o desenvolvimento de
7 probióticos endêmicos. Estas bactérias probióticas vão induzir ou restaurar a microbiota
8 comprometida para uma condição considerada normal. Desta forma, a contagem e
9 identificação dos micro-organismos é importante para se entender como as bactérias
10 probióticas modulam as respostas dos hospedeiros.

11 A comunidade bacteriana de animais de água doce e de água salgada são
12 bastante distintas (Sullam et al., 2012), portanto, os probióticos desenvolvidos para um
13 animal de um destes ambientes não deveria ser usada para animais de outro ambiente.
14 Ainda sim, a microbiota de alguns peixes apresenta grande semelhança com a
15 microbiota de animais terrestres (Sullam et al., 2012). Nestes casos, avaliações
16 posteriores e mais detalhadas devem ser realizadas para se determinar a melhor
17 utilização de probióticos comerciais. Além disso, a introduções de espécies ou linhagens
18 bacterianas exóticas devido ao uso de probióticos comerciais devem ser consideradas
19 nestas avaliações. Isso pode trazer problemas com transferências gênicas (como
20 resistência a antibióticos, por exemplo), ocupar nichos e alterar cadeia alimentar
21 microbiana (Qi et al., 2009).

22 Os resultados obtidos no Capítulo 1, com a técnica de FISH, indicam uma maior
23 similaridade da comunidade bacteriana do intestino das tilápias com a comunidade
24 bacteriana da água, o que sugere que as bactérias probióticas podem ser ministradas
25 através de sua adição a água para, então, colonizar o intestino dos peixes. Não havendo,
26 portanto, a necessidade de administrá-las juntamente com a ração. Pode-se sugerir,
27 ainda, que as bactérias isoladas da água, com capacidade probiótica, podem colonizar
28 mais facilmente os intestinos das tilápias, diferentemente daquelas isoladas do
29 sedimento.

1 A técnica de FISH também mostrou ser uma excelente ferramenta para
2 acompanhar a permanência e ação das bactérias probióticas nos intestinos dos animais
3 (Capítulo 2). Os resultados mostraram a eficiência de um isolado bacteriano endêmico
4 no que se refere à capacidade de se estabelecer no intestino, bem como no controle de
5 bactérias potencialmente patogênicas presentes no trato intestinal do hospedeiro. Até
6 bem pouco tempo, apenas metodologias dependentes de cultivo eram utilizadas para
7 verificar esta capacidade de colonização e ação dos probióticos. Entretanto, problemas
8 metodológicos decorrente desta técnica podem levar a imprecisões nas quantificações e
9 identificações das bactérias (Temmerman et al., 2004). Assim, os resultados
10 apresentados aqui mostram que a técnica de FISH pode ser utilizada para este mesmo
11 fim, mas de forma mais precisa e rápida.

12

13 ***Bactérias e qualidade da água:***

14 A boa qualidade da água nos sistemas de recirculação também depende
15 diretamente da atividade da comunidade bacteriana. Nestes tipos de sistema de
16 produção de organismos aquáticos, a comunidade bacteriana é influenciada pelo manejo
17 do sistema e pela associação da microbiota com os animais que estão sendo produzidos
18 (Blancheton et al., 2013). Desta forma, para se manter os animais saudáveis não basta
19 apenas controlar a qualidade de água, mas principalmente manejar a microbiota que está
20 no sistema para que a água esteja sempre em boas condições, para não ser esta uma
21 fonte de estresse para peixes, crustáceos ou moluscos (Michaud et al., 2009).

22 A nitrificação, que ocorre em duas etapas realizadas pelas bactérias
23 autotróficas nitrificantes, é o que garante o bom funcionamento de sistemas de
24 recirculação. Neste processo, as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) são
25 responsáveis pela oxidação da amônia a nitrito, enquanto que as bactérias oxidadoras de
26 nitrito (NOB) transformam o nitrito em nitrato (Ebeling et al., 2006). Desta forma, as
27 concentrações destes dois compostos tóxicos aos animais (amônia e nitrito) não chegam
28 a níveis preocupantes para a produção dos mesmos. Como observado nos resultados do
29 Capítulo 3, as bactérias nitrificantes presentes no biofilme do sistema estudado foram
30 primordiais para que o processo de nitrificação fosse eficiente e rápido.

1 A utilização de metodologias dependentes de cultivo, mesmo que necessárias em
2 alguns casos, muitas vezes não fornecem as informações precisas sobre a comunidade
3 bacteriana. Conhecidamente existe um lapso de informações que podem ser geradas
4 pelas técnicas dependentes de cultivos, geralmente subestimando os dados observados.
5 Isso porque muitas bactérias não crescem nos meios de cultivos normalmente utilizados
6 (Temmerman et al., 2004). Estudos com metodologias dependentes de cultivo acabam
7 sendo demorados e pouco precisos (Asfie et al., 2003), trazendo incertezas sobre a
8 diversidade e a quantidade das bactérias. Sullam et al. (2012), em um trabalho de meta-
9 análise com dados de metodologias dependentes e independentes de cultivo,
10 encontraram diferenças na comunidade bacteriana dos diferentes peixes. Entretanto,
11 quando utilizaram apenas os dados de metodologias cultivo dependentes, as
12 comunidades bacterianas dos peixes foram consideradas semelhantes.

13

14 **A Técnica de FISH como instrumento de avaliação de bactérias na aquacultura:**

15 Enquanto as técnicas cultivo dependentes trazem variações de abundância entre
16 10^3 a 10^9 CFU . g⁻¹, as técnicas independentes de cultivo mostram variações de 10^9 a
17 10^{10} células . g⁻¹ (Nayak, 2010b). Além disso, a possibilidade de usar técnicas
18 moleculares independentes de cultivo contribui para um exame mais acurado e
19 entendimento da complexidade das comunidades bacterianas (Pérez et al., 2010).

20 Com isso, as metodologias de biologia molecular independentes de cultivo
21 aparecem como importantes ferramentas para acessar a diversidade de micro-
22 organismos destes ambientes. Informações mais precisas a partir destes dados refinam o
23 entendimento das possíveis relações da microbiota com os animais produzidos e com o
24 ambiente de produção.

25 A técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), que foi utilizada nos três
26 trabalhos aqui apresentados, tem a vantagem de ser capaz de identificar grupos
27 bacterianos específicos e, com auxílio de um microscópio, contar as células bacterianas
28 marcadas. Isso faz com que a quantificação direta dos táxons específicos seja realizada
29 e informações mais precisas em relação à estrutura da comunidade bacteriana sejam
30 determinadas (Qi et al., 2009; Capítulos 1, 2 e 3). Os resultados apresentados nesta Tese

1 demonstram que a técnica de FISH é um instrumento que poderá ter muitas outras
2 aplicações para o melhor entendimento da ecologia de micro-organismos em sistemas
3 de aquacultura.

4 No entanto, algumas limitações da técnica de FISH devem ser levadas em
5 consideração. Uma dessas limitações pode ser a escolha da sonda que identifica o
6 grupo-candidato, ou seja, é preciso se ter uma ideia prévia de quais grupos bacterianos
7 devem ser monitorados. Como as sondas são para identificação e contagem específica
8 de grupos de bactérias, se esta não for bem escolhida, pode gerar resultados não
9 conclusivos. Mesmo sendo uma técnica altamente específica, resultados falso-positivos
10 (devido à autofluorescência) e falso-negativos (devido a pouca penetração das sondas
11 nas células ou pouca quantidade de RNAr) podem atrapalhar as contagens (Moter e
12 Gölbe, 2000; Neves e Guedes, 2012). Além disso, a técnica de FISH utilizada sem
13 combinação com outra metodologia, não nos permite medir e indicar a diretamente a
14 atividade das bactérias identificadas. Neste caso, vai permitir apenas a inferência da
15 relação da abundância dos grupos identificados com a sua possível atividade.

16 Portanto, a partir dos resultados obtidos nesta Tese, podemos concluir que:

- 17 1) A microbiota das tilápias é determinada pela microbiota presente na água do
18 ambiente de produção. Isso é importante para se monitorar a microbiota
19 presente nas tilápias a partir de amostras da água, o que torna o
20 monitoramento mais simples de ser feito.
- 21 2) Bactérias potencialmente probióticas podem ser isoladas do próprio
22 ambiente de produção ou da própria espécie alvo. O *Bacillus* sp., isolado do
23 intestino das tilápias, colonizou eficientemente o trato intestinal das tilápias e
24 controlou duas espécies bacterianas patogênicas para peixes. Estes são dois
25 pré-requisitos importantes para a obtenção de um bom probiótico.
- 26 3) As bactérias nitrificantes que cresceram aderidas ao biofilme apresentaram
27 maior relação com as transformações dos compostos nitrogenados do que as
28 bactérias livres na água. Isso mostra que a presença de substratos para a
29 adesão e crescimento do biofilme favorece a eficiência dos sistemas de
30 recirculação.

1

2 **Perspectivas de futuros estudos:**

3 Este estudo demonstrou o grande potencial da técnica de FISH. Entretanto,
4 trabalhos futuros devem ser realizados para melhorar nossa compreensão da interação
5 entre a microbiota e os animais aquáticos produzidos.

6 Um destes trabalhos é fazer o estudo avaliando a microbiota das tilápias
7 (*Oreochromis niloticus*) desde a fase larval até a época do abate com o tratamento de
8 probióticos, de forma a avaliar a permanência dos probióticos mesmo após a suspensão
9 da oferta aos animais.

10 Outra avaliação importante seria caracterizar a microbiota de diferentes animais
11 produzidos em um mesmo empreendimento e de mesma espécie de peixe em diferentes
12 empreendimentos. Com essa avaliação, poderá se verificar o grau de semelhança destas
13 microbiotas, a fim de criar padrões, a partir da composição da comunidade bacteriana,
14 dos animais produzidos e dos locais de produção. Isso poderia servir de base para a
15 criação de um “selo” para identificação e rastreabilidade dos produtos aquícolas.

16 Ainda, sugere-se estudar o impacto de diferentes tipos de sistemas de
17 aquacultura sobre a microbiota local e do corpo de água receptor dos efluentes. Isso será
18 de grande valia para se estabelecer ações mitigadoras e de recuperação da microbiota
19 que mantêm o sistema de produção em condições mais saudáveis.

20 Além disso, é necessário fazer mais testes com o potencial probiótico obtido no
21 capítulo 2 para seguir no processo de produção do probiótico. Os próximos testes a
22 serem realizados são de detecção de plasmídeos com genes de resistência, grau de
23 resistência a antibióticos e capacidade de patogenicidade a animais. Estes testes serão
24 realizados para verificar a potencialidade de utilização futura em produções comerciais
25 de tilápias.

26

27 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 Asfie M, Yoshijima T, Sugita H (2003) Characterization of the goldfish fecal microflora
2 by the fluorescent *in situ* hybridization method. *Fisheries Science* 69: 21-26.
- 3 Blancheton J, Attramadal K, Michaud L, d'Orbcastel E, Vadstein O (2013) Insight into
4 bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural
5 Engineering* 53: 30-39.
- 6 Ebeling J, Timmons M, Bisogni J (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of
7 photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in
8 aquaculture systems. *Aquaculture* 257: 346-358.
- 9 Michaud L, Lo Giudice A, Troussilier M, Smedile F, Bruni V, Blancheton J (2009)
10 Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a
11 marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1935-
12 1946.
- 13 Moter A, Göbel U (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct
14 visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41: 85-112.
- 15 Nayak S (2010a). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish
16 Immunology* 29: 2-14.
- 17 Nayak S (2010b) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 41:
18 1553-1573.
- 19 Neves S, Guedes R (2012) Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e
20 perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária.
21 Arquivos do Instituto Biológico 79: 627-632.
- 22 Pérez T, Balcázar J, Ruiz-Zarzuela, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Múzquiz J
23 (2010) Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal
24 Immunology* doi: 10.1038/mi.2010.12.
- 25 Qi Z, Zhang X-H, Boon N, Bossier P (2009) Probiotics in aquaculture of China –
26 current state, problems and prospect. *Aquaculture* 290: 15-21.

- 1 Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y (1998) Production of the antibacterial
2 substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish.
3 Aquaculture 165: 269-280.
- 4 Sullam K, Essinger S, Lozupone C, O'Connor M, Rosen G, Knight R, Kilham S, Russel
5 J (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities
6 of fish: a meta-analysis. Molecular Ecology 21: 3363-3378.
- 7 Temmerman R, Huys G, Swings J (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-
8 dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science and Technology
9 15: 348-359.
- 10 Wong S, Rawls J (2012) Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by
11 host ecology and environment. Molecular Ecology 21: 3100-3102.

12

1

ANEXO 1

2 **ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA AQUACULTURE RESEARCH**

3 **BACTERIAL COMMUNITY OF POND'S WATER, SEDIMENT AND IN THE**
4 **GUTS OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) JUVENILES CHARACTERIZED BY**
5 **FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION TECHNIQUE**

6 **Alessandro Del'Duca^{1*}, Dionéia Evangelista Cesar² and Paulo César Abreu³**

7 **¹ Post-Graduation Course on Aquaculture. Institute of Oceanography. Federal**
8 **University of Rio Grande – FURG. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, Postal**
9 **Code 96201-900; alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br**

10 **² Departament of Biology, Federal University of Juiz de Fora – UFJF. Juiz de**
11 **Fora, Minas Gerais, Brazil, Postal Code 36036-900; dioneia.cesar@ufjf.edu.br**

12 **³ Institute of Oceanography. Federal University of Rio Grande – FURG. Rio**
13 **Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, Postal Code 96201-900; docpca@furg.br**

14 *** Author to whom correspondence should be addressed: Alessandro Del'Duca;**
15 **Federal Institute of Southeastern of Minas Gerais, Campus Juiz de Fora –**
16 **Bernardo Mascarenhas Street, 1283, Fábrica. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil,**
17 **Postal Code 36080-001; Tel +55 32 4009-3007; e-mail address:**
18 **alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br**

19 **Running Title: Bacteria similarity in fish, water and sediment**

20 **Keywords: Bacterial Community; Bacterial Similarity; Probiotic Bacteria;**
21 **Pathogenic Bacteria; Tilapia.**

22

1 **ABSTRACT**

2 Information about bacterial community structure and functioning in fish farming ponds
3 remains scarce, mainly due to methodological difficulties in counting and identifying
4 uncultured bacteria. The main objective of this study was to evaluate the degree of
5 similarity between the bacterial community of the digestive tract of tilapia
6 (*Oreochromis niloticus*) juveniles and that of the test pond's water and sediment, using
7 the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique. Samples of water, sediment and
8 gut content of 30 tilapia juveniles from a single nursery ground were collected in
9 January 2010. Potentially probiotic and pathogenic bacteria of the species *Bacillus*,
10 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*,
11 *Lactobacillus farciminis*, *Vibrio* and *Pseudomonas fluorescens* were found in different
12 samples using specific fluorescent probes. The similarity between bacterial community
13 environments and gastrointestinal tracts was determined by the Morisita-Horn index.
14 The fish guts presented higher abundances of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus*,
15 *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus collinoides*. The bacterial community
16 composition of tilapia gastrointestinal tract was more similar to the water than the
17 sediment of the pond. The results of this study showed that the FISH technique can be
18 easily used for monitoring of probiotics and pathogen detection in aquaculture systems.

19

20 **INTRODUCTION**

21 Bacterial composition and activity in aquaculture systems is not yet understood
22 in detail, mainly due to methodological difficulties concerning the counting and
23 identification of uncultured bacteria. Differences in bacterial abundances determined by
24 conventional methods (isolation and cultivation) in comparison with molecular biology
25 techniques in different aquatic environments suggest that the abundance and diversity of
26 these microorganisms may also be underestimated in aquaculture environments
27 (Spangaard, Huber, Nielsen, Nielsen, Appel & Gram 2000; Dhanasiri, Brunvold,
28 Brinchmann, Korsnes, Bergh & Kiron 2011).

29 The endemic microbiota of fish ponds can be a source of infectious agents, but
30 also can furnish microorganisms that prevent diseases due to the competition with

1 pathogenic bacteria for nutrients and also due to the production of antibiotic substances
2 (Moriarty 1999; Spangaard, Huber, Nielsen, Nielsen, Appel & Gram 2000; Hagi,
3 Tanaka, Iwamura & Hoshino 2004). Thus, the study of this community can show
4 potential bacterial microorganisms for use as probiotics. Likewise, molecular biology
5 techniques may allow better visualization of pathogenic and probiotic bacteria directly
6 in aquaculture habitats and fish guts (Del'Duca, Cesar, Diniz & Abreu 2013).

7 Another important issue to be investigated is the interaction of raised organism
8 with the microbiota of different compartments of the culture system. For example,
9 Ringo, Olsen, Mayhew & Myklebust (2003) discussed the matter of whether farmed
10 fish gut microbiota has a greater influence on autochthonous/indigenous bacteria or
11 allochthonous/transient species. One way to detect the contribution of an allochthonous
12 bacterial community is by analyzing the similarity of the fish intestinal tract with the
13 environment. Thus, the characterization of the bacterial community of aquaculture
14 systems can be one of important in improving management of aquaculture activities.

15 The objective of this study was to determine the similarity of the bacterial
16 community of the intestinal tract of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in
17 comparison with the microbiota of water and sediment of fishponds. For this
18 comparison a molecular biology technique was used, specifically, fluorescent *in situ*
19 hybridization (FISH), which enables the direct enumeration of bacteria of specific
20 groups without the necessity of previous isolation and culture.

21

22 MATERIAL AND METHODS

23 Raising fish conditions and sampling

24 Water, sediment and gastrointestinal tract of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
25 samples were collected in a fish pond at the Experimental Farm of Leopoldina at
26 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (FELP/EPAMIG) for
27 microbiological analysis. The pond has an area of 1,200 m² and the maximum water
28 depth of 1.0 m, where fish were raised in semi-intensive conditions with water flow

1 estimated at $10 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$. The inlet and outlet of water occurred through the top of fish
2 pond. The rate of water exchange about 8.6% of total volume per day.

3 The fish were stocked in the nursery for 60 days at a density of three fish per m^2 .
4 The average total length and weight of tilapia juveniles was $8.2 \pm 1.5 \text{ cm}$ and 11.2 ± 5.7
5 g, respectively.

6 The feed used for feeding of tilapia juveniles contained 28% crude protein, 6%
7 crude lipid, $12,979 \text{ kJ} \times \text{kg}^{-1}$ of digestible energy, 2.5% calcium, 1% phosphorus and
8 275 mg of vitamin C (Soma ®). The amount of feed offered on a daily basis was ca. 2%
9 of the total fish biomass in the pond.

10 The sampling was performed in January 2010. Two water samples (near inlet
11 and near outlet) were collected in the pond at the sub-surface with a bucket. Two
12 sediment samples were collected from the bottom of the pond near inlet and outlet using
13 a core sampler. Since there were no statistical differences between samples, we
14 considered the average of both samples as representative water and sediment samples.
15 Thirty tilapia juveniles were collected for removal of their intestinal tracts. The
16 collected fish were killed by heat shock as a result of submersing the fish in ice-cold
17 water. Afterwards, their guts were removed. Samples of water, sediment and
18 gastrointestinal tracts were stored in sterile bottles and fixed with paraformaldehyde 2%
19 final concentration.

20

21 **Sample processing and Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)**

22 Water samples were filtered through a Nuclepore® polycarbonate membrane
23 filters (pore $0.2 \mu\text{m}$) and stored under refrigeration. Samples of sediment and gut
24 content were treated separately as described by Epstein & Rossel (1995). To these
25 samples it was added 0.0001% Tween solution and they were sonicated (Vibra Cell
26 VCX 130PB, Sonics & Materials®) three times (range $110.7 \mu\text{m}$ per 60 s). After
27 sonication, the samples were centrifuged at 500 g for five minutes. The supernatant was
28 stored and the remaining content washed twice using ultra-pure water. The three
29 fractions of supernatants were placed in the same bottle and then shaken vigorously.

1 Subsequently, the material was centrifuged under the same conditions described above.
2 Aliquots of each sample were filtered through polycarbonate filters (Nuclepore® - 0.2
3 µm) and filter stored in the refrigerator until the hybridization process.

4 Samples of the water, sediment and of gastrointestinal contents were submitted
5 to Fluorescent *in situ* Hybridization protocol (Cottrell & Kirchman 2003) with rRNA-
6 targeted oligonucleotide probes selected to identify groups of potential probiotic
7 bacteria (*Bacillus* and *Lactobacillus* spp.), or pathogens (*Vibrio* and *Pseudomonas* sp.)
8 for fish (Table 1). A negative control probe, without specificity for any bacteria, was
9 used to evaluate the efficiency of hybridization. All probes were targeted with the
10 fluorochrome Cy3. The abundance of bacteria was obtained by direct counting at 1000
11 x final magnification using an epifluorescence microscope (Olympus® BX-60)
12 equipped with the following set of filters: Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2
13 and U-MWG2.

14

15 **Bacterial community similarity and statistical analysis**

16 The similarity of bacterial communities of different samples was determined by
17 the Morisita-Horn index. This index takes into account the density of each taxonomic
18 group, and values range from 0 (less similar) and 1 (more similar) (Martiny, Bohannan,
19 Brown, Colwell, Fuhrman, Green, Horner-Devine, Kane, Krumins, Kuske, Morin,
20 Naeem, Ovreas, Reysenbach, Smith & Staley 2006).

21 The data were tested for normality by the D'Agostino test. The single criterion
22 variance analysis (ANOVA - one way) and an *a posteriori* Tukey's test were used for
23 normal data and the Kruskal-Wallis test was used for non-normal data utilizing BioEstat
24 5.0 software (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá). Both cases were
25 considered significant for values $P < 0.05$ (Zar 1999).

26

27

28

1 **RESULTS**

2 Total bacterial abundance of the intestinal tract of juvenile tilapia ($3.80 \pm 1.10 \cdot 10^7$ cells·mL $^{-1}$) was significantly higher than that of water ($0.82 \pm 0.01 \cdot 10^7$ cells·mL $^{-1}$)
3 and sediment ($1.64 \pm 0.02 \cdot 10^7$ cells·mL $^{-1}$) of the pond (Fig. 1). The bacterial groups
4 analyzed in the different systems also showed significant differences. In the
5 gastrointestinal tract of juvenile tilapia and water, the abundances of *Lactobacillus*
6 *brevis*, *Lactobacillus collinoides* and *Pseudomonas fluorescens* were significantly
7 higher than other bacterial groups (Table 2). In the case of sediment, *P. fluorescens*
8 abundance was higher than the abundance of the other groups evaluated (Table 2).

10 Comparing the abundance of bacterial groups in the tilapia gastrointestinal tract,
11 water and sediment, the abundance of *Bacillus* and *Lactobacillus farciminis* were
12 significantly higher in fish than those in the other two environments. The abundance of
13 *L. brevis* and *Vibrio* were significantly higher in fish than in sediment. Furthermore, *P.*
14 *fluorescens* abundance was higher in fish than in water (Table 2).

15 We found that the proportional value of *Bacillus* were significantly higher in fish
16 than in water and in sediment. The abundance of *L. collinoides* was significantly higher
17 in water than in fish and in sediment. The *L. brevis* and *Vibrio* abundances were similar
18 in fish and water samples, and both were significantly higher than that found in the
19 sediment (Fig. 2).

20 The percentage of non-hybridizing bacteria in sediment (ca. 78% of total
21 bacterial abundance) was significantly higher than in fish gut and in water samples (ca.
22 52% and 44% of total bacteria abundance, respectively). The bacterial community of
23 the gastrointestinal tract of tilapia showed greater similarity to water microbiota (0.88 ± 0.07)
24 and was significantly higher than the similarity of the bacterial community of fish
25 in relation to the pond sediment (0.75 ± 0.13) (Table 3). The similarity of the bacterial
26 community in water and sediment was $0.79 (\pm 0.0001)$.

27

28

29

1 **DISCUSSION**

2 Microorganisms play an essential role in most aquaculture systems. They help in
3 nutrient cycling, maintenance of water quality, animal nutrition, and can control
4 pathogens by competitive exclusion and/or production of antibiotic substances
5 (Moriarty 1997). However, their presence under unbalanced conditions can generate
6 important disease break-ups, with high commercial losses (Inglis, Roberts & Bromage
7 2001).

8 The rapid and accurate identification of bacteria in the fishpond environment is,
9 therefore, essential to establish strategies to prevent and combat diseases, and for the
10 development of probiotics (Moriarty 1997; Hopkins, Sharp & Macfarlane 2001). The
11 advance of new techniques based on molecular biology allows the precise identification
12 of culturable and non-culturable bacterial groups, or species. However, PCR-based
13 methods are expensive and time consuming. Moreover, these methods do not give any
14 information about bacterial cells abundance, size or morphology. The FISH technique,
15 on the other hand, enables the identification and quantification of bacterial species in a
16 rapid and accurate way through the use of epifluorescence and confocal microscopy, or
17 flow cytometry (Zwirglmaier 2005). Thus, as observed by Moter & Göbel (2000), the
18 FISH technique combines the precision of molecular biology with the versatility of
19 microscopic observation.

20 The FISH method is based on the hybridization of a fluorescent rRNA-targeted
21 oligonucleotide probe with a specific region of the bacteria 16S rRNA. Cells marked
22 with the probe can be differentiated by the use of specific light filters. This technique
23 has been used in different studies in aquaculture systems to, for instance, characterize
24 the water and effluents microbiota (Garcia & Olmos 2007; Paungfoo, Prasertsan &
25 Burrell 2007; Payne, Hall, Sly & Bourne 2007; Pereira, Salvador, Arrojado, Silva,
26 Santos, Cunha, Gomes & Almeida 2011); to follow the microbial biofilm formation in
27 bioreactors in recirculation systems (Cytryn, Minz, Gieseke & Rijn 2006); and even to
28 characterize the gut microbial community of goldfish (*Carassius auratus*) (Asfie,
29 Yoshijima & Sugita 2003), trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) (Huber, Spangaard,
30 Appel, Rossen, Nielsen & Gram 2004) and seahorse (*Hippocampus guttulatus*)
31 (Balcázar, Lee, Pintado & Planas 2010). However, to our knowledge, no study has so

1 far used the FISH technique to identify the bacteria of the intestinal tract of tilapia
2 species.

3 In this study, we used FISH probes to identify bacterial species already
4 employed as probiotics for tilapia (Jatobá, Vieira, Buglione Neto, Silva, Mourão,
5 Jerônimo, Dotta & Martins 2008; Zhou, Tian, Wang & Li 2010), like *Bacillus* and
6 *Lactobacillus brevis*. Similarly, we have evaluated the presence of *Lactobacillus*
7 *collinoides*, *Lactobacillus farciminis* and *Lactobacillus coryniformis* that have been
8 reported as potential probiotics for non-aquatic animals (Tamura, Hori & Nakagawa
9 2009; Grimoud, Durand, Courtin, Monsan, Ouarné, Theodorou & Roques 2010; Tuo,
10 Zhang, Han, Du, Zhang, Yi, Zhang & Jiao 2011). On the other hand, the use of *Vibrio*
11 and *Pseudomonas fluorescens* probes were chosen due to the pathogenic action of these
12 species on tilapia (Flick 2008).

13 Using these probes we have observed high similarity of microbiota of
14 *Oreochromis niloticus* gut with that of the growing pond water (0.88 ± 0.07),
15 significantly higher than in sediment (0.75 ± 0.13). This is not surprising, since
16 juveniles of tilapia present a planktonic filter-feeding mode, with little interaction with
17 the sediment. Moreover, previous results have demonstrated that tilapia (*Oreochromis*
18 *niloticus*) is able to detect free bacteria in the water and increase their consumption by
19 the enhancement of opercular beat rate (Beveridge, Begum, Frerichs & Millar 1989).

20 Similar results were obtained by Al-Harbi & Uddin (2003 and 2005), studying
21 the microbiota of fishponds and intestinal tracts of tilapia, raised in fresh and brackish
22 waters, although these authors considered that bacteria present in the water and
23 sediment of tilapia ponds equally influenced the microbial composition of this fish.
24 Zeng, Ma, Wei, Jiao, Tang, Wu & Jian (2010) also found that bacterial community
25 composition of water is strongly influenced by the microbiota of sediment.

26 Highest bacterial similarity between fish gut and water found in our study can be
27 explained by the high hybridization of total bacteria abundance (ca. 48% and 56%
28 respectively) to the probes used, whereas in the sediment, hybridization was only ca.
29 22% of total bacteria abundance. The high value of non-hybridized bacteria (ca. 78% of
30 total bacteria) indicates that sediment of the pond is a potential pool of different

1 bacterial groups. It is well known the importance of sediment in storage fish pathogens
2 (Vezzulli, Chelossi, Riccardi & Fabiano 2002; Walling, Vourey, Ansquer, Beliaeff &
3 Goarant 2010).

4 However, exchange of water microbiota and sediment of this aquaculture pond
5 was not as intense as expected, since similarity of bacterial community of water and
6 sediment was not so high (0.79 ± 0.0001). It is very likely that the lack of interaction
7 between sediment and water column resulted from the daily exchange of pond water, a
8 common action used to keep the water quality in good standard in semi-intensive
9 aquaculture systems. Thus, the low interaction between bacteria of the sediment and
10 water should not have a major impact on the spread of pathogenic bacteria present in the
11 sediment.

12 It is noteworthy the fact that the most abundant bacteria in the tilapia gut
13 (*Pseudomonas fluorescens*) is a highly pathogenic species. *Pseudomonas fluorescens* is
14 known to cause septicemia in several species of raised fish, especially when organisms
15 are stressed, or when water quality decays (Inglis, Roberts & Bromage 2001). Its
16 virulence is probably the result of the secretion of a metalloprotease used by the bacteria
17 to degrade proteins (Zhang, Hu, Wang & Sun 2009). However, this same species has
18 been considered as a potential probiotic, since it can control the growth of *Vibrio*
19 *anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* (Gram, Melchiorse, Spanggaard, Huber &
20 Nielsen 1999; Balcázar, Blas, Ruiz-Zarzuela, Cunningham, Vendrell & Músquiz 2006;
21 Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan & Gibson 2008). The result of our studies and
22 previous reports (Al-Harbi & Uddin 2003 and 2005) demonstrate that *P. fluorescens* is a
23 common and dominant species in healthy tilapia guts. Thus, disease outbreaks may
24 occur without external contamination, mainly as the result of fish stress due to improper
25 aquaculture management.

26 Several diseases caused by bacteria are reported due to the intensification of
27 cultivation and to lack of monitoring of the environmental microbiota, which
28 demonstrates the need for detailed studies to control pathogens (Ringo & Gatesoupe
29 1998; Erondu & Anyanwu 2005; Buchanan, Colvin, Vicknair, Patel, Timmer & Nizet
30 2008; Soto, Hawke, Fernandez & Morales 2009). Antimicrobial drugs have always been
31 used indiscriminately in aquaculture farms in an attempt to eradicate diseases. However,

1 its use is questioned for causing serious public health and ecological problems, like the
2 production of more resistant microorganisms and loss of bacterial diversity (Ravi,
3 Musthafa, Jegathammbal, Kathiresan & Pandian 2007). In this context, probiotic
4 bacteria appear to be an alternative for the control of pathogens. Probiotic bacteria
5 should improve resistance to bacterial diseases in fish, by producing inhibitory
6 compounds to pathogens or competing with them for nutrients (Gatesoupe 1999;
7 Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan & Gibson 2008). The action of probiotic bacteria is
8 often specific, so it is very important we know the ecology of bacteria in the aquaculture
9 environment (Nayak & Mukherjee 2011). Moreover some bacteria may contribute
10 indirectly to the fish health by keeping water quality in good standard (Panigrahi &
11 Azad 2007).

12 The other most abundant bacteria found in guts of tilapia in this study were
13 *Lactobacillus collinoides* and *L. brevis*. This last species is already used as a probiotic
14 in aquaculture (Balcázar, Lee, Pintado & Planas 2010). Other *Lactobacillus* and
15 *Bacillus* species have great potential to be used as disease inhibitors (Balcázar, Blas,
16 Ruiz-Zarzuela, Cunningham, Vendrell & Músquiz 2006; Kesarcodi-Watson, Kaspar,
17 Lategan & Gibson 2008). Currently, most commercial probiotics used in aquaculture
18 have been isolated from terrestrial animals (Nayak 2010). However, it would be
19 preferable to isolate probiotic species from the gastrointestinal tract of the animal itself,
20 or from the aquaculture farm environment avoiding, therefore, the introduction of exotic
21 species in local aquaculture systems. Research already points to the possibility of
22 isolating the probiotic bacteria grown in the intestinal tracts of raised animals, with
23 good results (Gatesoupe 1999; Ghosh, Sinha & Sahu 2007; Aly, Abd-El-Rahman, John
24 & Mohamed 2008; Nayak & Mukherjee 2011; Del'Duca, Cesar, Diniz & Abreu, 2013).

25 The results of this study clearly demonstrated that the Fluorescent *in situ*
26 Hybridization (FISH) technique is a powerful tool to be used in aquaculture. As the type
27 of aquaculture system and water microorganism contamination can directly influence
28 fish microbiota (Pond, Stone & Alderman 2006; Mandal, Hasan, Rahman, Manik,
29 Mahmud & Islam 2009), knowing the structure of the bacterial community of the
30 environment is vital to understand the bacterial composition within the intestinal tract of
31 fish (Sousa & Silva-Souza 2001). In this case, the FISH technique is efficient to monitor

1 qualitative and quantitative microbiological changes. With this rapid diagnosis of
2 bacteria, mitigating actions can be taken quickly thus avoiding potential economic
3 losses of farmed aquatic animals. Similarly, this technique can help to control the
4 discharge of large amounts of pathogenic bacteria to the environment due to pond water
5 exchange, which could result in health problems for wild organisms. Other potentiality
6 of the FISH method would be the monitoring of probiotic organisms in aquaculture
7 systems and in the fish guts. Using this technique it would be possible to track any
8 added probiotic bacteria through all compartments in the ponds and also to verify if the
9 bacteria are being incorporated in fish gut microbiota (Del'Duca, Cesar, Diniz & Abreu
10 2013). In summary, the results of this study show that the FISH technique can be easily
11 used for monitoring of probiotics and pathogen detection in aquaculture systems.

12

13 **ACKNOWLEDGEMENTS**

14 We thank the Empresa de Pesquisa Agropecuária of Minas Gerais (EPAMIG),
15 especially to Dr. T. Freato by support provided at the Experimental Farm of Leopoldina
16 (FELP/EPAMIG). We thank E. Rodrigues for help in processing samples for analysis
17 by FISH. Financial support and grants consent by CNPq (Process 145337/2009-0). P. C.
18 Abreu is Research Fellow of the National Council for the Scientific and Tecnological
19 Development (CNPq).

20

21 **REFERENCES**

- 22 Al-Harbi A. & Uddin N. (2003) Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of
23 hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) cultured in earthen ponds in
24 Saudi Arabia. *Aquaculture Research* **34**, 43-48.
- 25 Al-Harbi A. & Uddin N. (2005) Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
26 cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* **250**, 566-572.

- 1 Aly S., Abd-El-Rahman A., John G. & Mohamed M. (2008) Characterization of some
2 bacteria isolated of *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics.
3 *Aquaculture* **277**, 1-6.
- 4 Asfie M., Yoshijima T. & Sugita H. (2003) Characterization of the goldfish fecal
5 microflora by the fluorescent *in situ* hybridization method. *Fisheries Science* **69**, 21-
6 26.
- 7 Balcázar J., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. & Músquiz J. (2006)
8 The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 171-183.
- 9 Balcázar J., Lee N., Pintado J. & Planas M. (2010) Phylogenetic characterization and in
10 situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus*
11 *guttulatus*) in captivity. *Systematic and Applied Microbiology* **33**, 71-77.
- 12 Beveridge M., Begum M., Frerichs G. & Millar S. (1989) The ingestion of bacteria in
13 suspension by the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **81**, 373-378.
- 14 Blasco L., Ferrer S. & Pardo I. (2003) Development of specific fluorescent
15 oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS*
16 *Microbiology Letters* **225**, 115-123.
- 17 Boye M., Ahl T. & Molin S. (1995) Application of a strain-specific rRNA
18 oligonucleotide probe targeting *Pseudomonas fluorescens* Ag1 in a mesocosm study
19 of bacterial release into the environment. *Applied and Environmental Microbiology*
20 **61**, 1384-1390.
- 21 Buchanan J., Colvin K., Vicknair M., Patel S., Timmer A. & Nizet V. (2008) Strain-
22 associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass. *Veterinary*
23 *Microbiology* **131**, 145-153.
- 24 Cottrell M. & Kirchman D. (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial
25 biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary.
26 *Limnology and Oceanography* **48**, 168-178.

- 1 Cytryn E., Minz D., Gieseke A. & Rijn J. (2006) Transient development of filamentous
2 *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor.
3 *FEMS Microbiology Letters* **256**, 22-29.
- 4 Del'Duca A., Cesar D., Diniz C. & Abreu P. (2013) Evaluation of the presence and
5 efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*)
6 using the fluorescent *in situ* hybridization. *Aquaculture* doi:
7 dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019.
- 8 Dhanasiri A., Brunvold L., Brinchmann M., Korsnes K., Bergh O. & Kiron V. (2011)
9 Changes in the intestinal microbiota in wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon
10 captive rearing. *Microbial Ecology* **61**, 20-30.
- 11 Epstein S. & Rossel J. (1995) Enumeration of sandy sediment bacteria: search for
12 optimal protocol. *Marine Ecology Progress Series* **117**, 289-298.
- 13 Erondi E. & Anyanwu P. (2005) Potential hazards and risks associated with
14 aquaculture industry. *African Journal of Biotechnology* **4**, 1662-1627.
- 15 Flick G. (2008) Bacterial, chemical, residues impact tilapia quality. *Global Aquaculture
Advocate* **11**, 32-33.
- 16 Garcia A. & Olmos J. (2007) Quantification by fluorescent *in situ* hybridization of
17 bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery.
18 *Aquaculture* **262**, 211-218.
- 19 Gatesoupe F. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* **180**, 147-165.
- 20 Ghosh S., Sinha A. & Sahu C. (2007) Isolation of putative probionts from intestine of
21 major Indian major carps. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **59**, 127-
22 132.
- 23 Gram L., Melchiorsen J., Spanggaard B., Huber I. & Nielsen T. (1999) Inhibition of
24 *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment
25 of fish. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 969-973.

- 1 Grimoud J., Durand H., Courtin C., Monsan P., Ouarné F., Theodorou V. & Roques C.
2 (2010) *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic
3 glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* **16**, 493-500.
- 4 Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y. & Hoshino T. (2004) Diversity and seasonal changes
5 in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*
6 **234**, 335-346.
- 7 Hopkins M., Sharp R. & Macfarlane G. (2001) Age and disease related changes in
8 intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and
9 community cellular fatty acid profiles. *Gut* **48**, 198-205.
- 10 Huber I., Spangaard K., Appel K., Rossen L., Nielsen T. & Gram L. (2004)
11 Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community
12 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied*
13 *Microbiology* **96**, 117-132.
- 14 Huggett M., Crocetti G., Kjelleberg S. & Steinberg P. (2008) Recruitment of the sea
15 urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing
16 bacteria in the field. *Aquatic Microbial Ecology* **53**, 161-171.
- 17 Inglis V., Roberts R. & Bromage N. (Eds.) 2001. *Bacterial diseases of fish*. Blackwell
18 Science, London, UK.
- 19 Jatobá A., Vieira F., Buglione Neto C., Silva B., Mourão J., Jerônimo G., Dotta G. &
20 Martins M. (2008) Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile
21 tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**, 1201-1207.
- 22 Kesacordi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. & Gibson L. (2008) Probiotics in
23 aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes.
24 *Aquaculture* **274**, 1-14.
- 25 Mandal S., Hasan M., Rahman M., Manik M., Mahmud Z. & Islam M. (2009) Coliform
26 bacteria in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* of shrimp-gher, pond and fish market.
27 *World Journal of Fish and Marine Science* **1**, 160-166.

- 1 Martiny J., Bohannan B., Brown J., Colwell R., Fuhrman J., Green J., Horner-Devine
2 M., Kane M., Krumins J., Kuske C., Morin P., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A-
3 L., Smith V. & Staley J. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on
4 the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 102-112.
- 5 Moriarty D. (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* **151**,
6 333-349.
- 7 Moriarty D. (1999) Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria.
8 microbial biosystems: new frontiers. In *Proceedings of the 8th international
9 symposium on microbial ecology* (ed. by C. Bell, M. Brylinsky, & P. Johnson-
10 Green), pp. 237-243. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax,
11 Canada.
- 12 Moter A. & Göbel U.B. (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct
13 visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **41**, 85-112.
- 14 Nayak S. (2010) Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish
15 Immunology* **29**, 2-14.
- 16 Nayak S. & Mukherjee S. (2011) Screening of gastrointestinal bacteria of major carps
17 for a candidate probiotic species for aquaculture practices. *Aquaculture Research* **42**,
18 1034-1041.
- 19 Panigrahi A. & Azad I. (2007) Microbial intervention for better fish health in
20 aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry* **33**, 429-440.
- 21 Paungfoo C., Prasertsan C. & Burrell P. (2007) Nitrifying bacterial communities in an
22 aquaculture wastewater treatment system using fluorescence *in situ* hybridization
23 (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis. *Biotechnology and
24 Bioengineering* **97**, 985–990.
- 25 Payne M., Hall M., Sly L. & Bourne D. (2007) Microbial diversity within early-stage
26 cultured *Panulirus ornatus* Phyllosomas. *Applied and Environmental Microbiology*
27 **73**, 1940-1951.

- 1 Pereira C., Salvador S., Arrojado C., Silva Y., Santos A., Cunha A., Gomes N. &
2 Almeida A. (2011) Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine
3 fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy. *Journal of*
4 *Environmental Monitoring* **13**, 1053-1058.
- 5 Pond M., Stone D. & Alderman D. (2006) Comparison of conventional and molecular
6 techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus*
7 *mykiss*). *Aquaculture* **261**, 194-203.
- 8 Ravi A., Musthafa K., Jegathammbal G., Kathiresan K. & Pandian S. (2007) Screening
9 and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in
10 marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 219-223.
- 11 Ringo E. & Gatesope F. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* **160**,
12 177-203.
- 13 Ringo E., Olsen R., Mayhew T. & Myklebust R. (2003) Electron microscopy of the
14 intestinal microflora of fish. *Aquaculture* **227**, 395-415.
- 15 Salzman N., de Jong H., Paterson Y., Harmsen H., Welling G., & Bos N. (2002)
16 Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new
17 group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* **148**, 3651-3660.
- 18 Soto E., Hawke J., Fernandez D. & Morales J. (2009) *Franciella* sp., an emerging
19 pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish*
20 *Diseases* **32**, 713-722.
- 21 Sousa J. & Silva-Souza A. (2001) Bacterial community associated with fish and water
22 from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and*
23 *Technology* **44**, 373-381.
- 24 Spangaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K. & Gram L. (2000) The
25 microbial of rainbow trout intestine: a comparasion of traditional and molecular
26 indetification. *Aquaculture* **182**, 1-15.

- 1 Tamura M., Hori S. & Nakagawa H. (2009) *Lactobacillus collinoides* JCM1123^T:
2 effects on mouse plasma cholesterol and isoflavonoids in the caecum. *Antonie Van
3 Leeuwenhoek* **96**, 621-626.
- 4 Tuo Y., Zhang L., Han X., Du M., Zhang Y., Yi H., Zhang W. & Jiao Y. (2011) *In vitro*
5 assessment of immunomodulating activity of the two *Lactobacillus* strains isolated
6 from traditional fermented milk. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*
7 **27**, 505-511.
- 8 Vezzulli L., Chelossi E., Riccardi G. & Fabiano M. (2002) Bacterial community
9 structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian sea (Western
10 Mediterranean). *Aquaculture International* **10**, 123-141.
- 11 Walling E., Vourey E., Ansquer D., Beliaeff B. & Goarant C. (2010) *Vibrio
12 nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediment. *Journal
13 of Applied Microbiology* **108**, 2003-2011.
- 14 Yokokawa T. & Nagata T. (2005) Growth and grazing mortality rates of phylogenetic
15 groups of bacterioplankton in coastal marine environments. *Applied and
16 Environmental Microbiology* **71**, 6799-6807.
- 17 Zar J. (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall Publisher. Upper Saddle River, USA.
- 18 Zeng Y., Ma Y., Wei C., Jiao N., Tang K., Wu Z. & Jian J. (2010) Bacterial diversity in
19 various coastal mariculture ponds in Southeast China and in diseased eels as revealed
20 by culture and culture-independent molecular techniques. *Aquaculture Research* **41**,
21 172-186.
- 22 Zhang W., Hu Y., Wang H. & Sun L. (2009) Identification and characterization of a
23 virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain.
24 *Veterinary Microbiology* **139**, 183-188.
- 25 Zhou X., Tian Z., Wang Y. & Li W. (2010) Effect of treatment with probiotics as water
26 additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune
27 response. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 501-509.

1 Zwirglmaier K. 2005. Fluorescent in situ hybridization (FISH) – The next generation.

2 *FEMS Microbiology Letters* **246**, 151 – 158.

3

1 **Figures Legends**

2 Fig. 1. Total bacterial abundance (10^7 cells·mL $^{-1}$) in fish, water and sediment from the
3 pond. Different letters indicate statistical differences.

4

5 Fig. 2. Relative bacterial abundance (% of total bacterial abundance) of *Bacillus*
6 (Bmy843), *Lact. brevis* (Lbrev), *Lact. collinoides* (Lcoll), *Lact. coryniformis* (Lcory),
7 *Lact. farciminis* (Lfarc), *Vibrio* (Vib519a) and *Ps. fluorescens* (PsAg1) in juveniles of
8 tilapia, water and sediment of pond. Different letters indicate statistical differences for
9 data of the same bacterial group.

1 **Tables**

2 Table 1. rRNA-targeted oligonucleotide probes of different bacterial species used in this
3 research. All probes were labeled with the fluorochrome Cy3.

Probe	Specificity	Sequence (5' - 3')	Target site (rRNA positions)	% FA*	Reference
NON	Negative Control	TAGTGACGCCGTCGA	-	30	Yokokawa and Nagata 2005
Bmy843	<i>Bacillus</i>	CTTCAGC ACTCAGGTTCG	843-860	35	Salzman et al 2002
Lbrev	<i>Lactobacillus brevis</i>	CATTCAACGGAAGCTCGTTC	64-83	35	Blasco et al 2003
Lcoll	<i>Lactobacillus collinoides</i>	CTTGATTTAACGGGATG	68-84	35	Blasco et al 2003
Lcory	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	GCTTCGGTC GACGTCAGT	70-87	35	Blasco et al 2003
Lfarc	<i>Lactobacillus farcininis</i>	AGCTTC AATCTTCAGGAT	72-89	35	Blasco et al 2003
PsAg1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GATAACTCGTCATC AGCTC	1520-1538	30	Boye et al 1995
Vib519a	<i>Vibrio</i>	ACC ACCTGCATGCGCTT	572-589	40	Hugget et al 2008

4 * Percentage of formamide (FA) in *in situ* hybridization buffer

5 Table 2. Bacterial abundance (mean \pm standard deviation of 10^6 cells·mL $^{-1}$) of *Bacillus* (Bmy843), *Lact. brevis* (Lbrev), *Lact. collinoides*
 6 (Lcoll), *Lact. coryniformis* (Lcory), *Lact. farciminis* (Lfarc), *Vibrio* (Vib519a) and *Ps. fluorescens* (PsAg1) in juveniles of tilapia, water
 7 and sediment of pond. Different lower case letters indicate statistical differences of data in rows. Different capital letters indicate statistical
 8 differences of data in columns.

Environment	Bmy843	Lbrev	Lcoll	Lcory	Lfarc	Vib519a	PsAg1
Fish	1.70 ± 1.29^{aA}	3.74 ± 3.30^{bA}	3.91 ± 2.68^{bA}	1.26 ± 0.81^{aA}	1.21 ± 0.60^{aA}	1.27 ± 0.91^{aA}	5.09 ± 2.70^{bA}
Water	0.05 ± 0.0001^{aB}	1.01 ± 0.08^{bAB}	1.46 ± 0.15^{bA}	0.38 ± 0.01^{aA}	0.13 ± 0.05^{aB}	0.21 ± 0.15^{aAB}	1.38 ± 0.21^{bB}
Sediment	0.10 ± 0.007^{aB}	0.12 ± 0.11^{aB}	0.78 ± 0.11^{aA}	0.40 ± 0.26^{aA}	0.08 ± 0.05^{aB}	0.03 ± 0.01^{aB}	2.13 ± 0.03^{bAB}

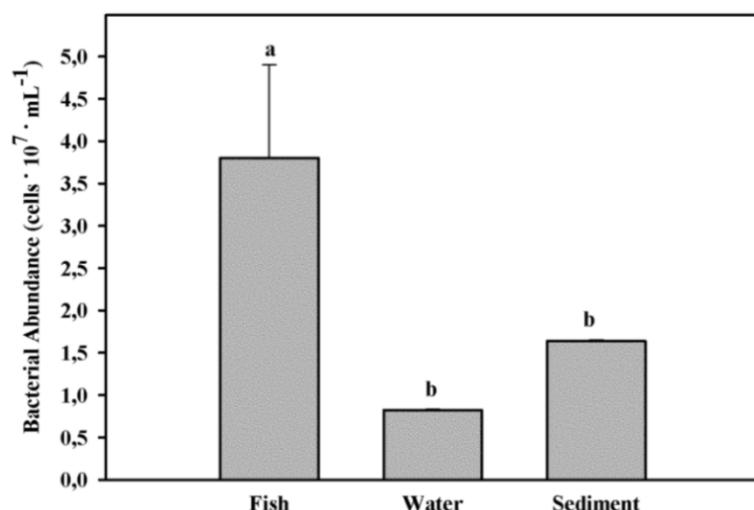
9

1 Table 3. Bacterial community similarity in the gastrointestinal tract of tilapia compared
2 to water and to sediment of the pond. Different letters indicate statistical differences of
3 data.

Environment	Mean ± SD	Minimum	Maximum	Similarity > 0.85
Water	0.88±0.07 ^a	0.73	0.98	70%
Sediment	0.75±0.13 ^b	0.38	0.93	17%

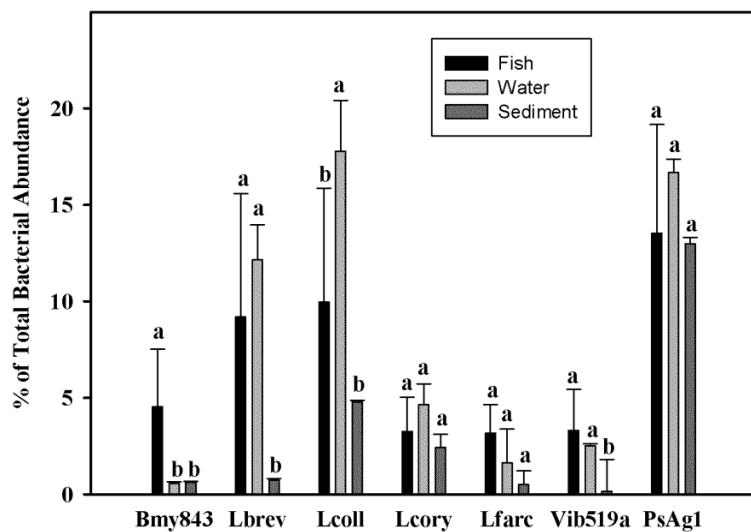
4

1 **Figures**



2

3 Fig. 1



1

2 Fig. 2

1

ANEXO 2

2

ARTIGO PUBLICADO NA AQUACULTURE

3

EVALUATION OF THE PRESENCE AND EFFICIENCY OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IN THE GUT OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) USING THE FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION TECHNIQUE

7 Alessandro Del'Duca^{a*}, Dionéia Evangelista Cesar^b, Cláudio Galuppo Diniz^c and
8 Paulo César Abreu^d

9 ^a Post-Graduation Course on Aquaculture. Institute of Oceanography. Federal University of Rio
10 Grande – FURG. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, Postal Code 96201-900;
11 alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br

12 ^b Departament of Biology. Federal University of Juiz de Fora – UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais,
13 Brazil, Postal Code 36036-900; dioneia.cesar@ufjf.edu.br

14 ^c Departament of Parasitology, Microbiology and Immunology. Federal University of Juiz de Fora
15 – UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, Postal Code: 36036-900; claudio.diniz@ufjf.edu.br

16 ^d Institute of Oceanography. Federal University of Rio Grande – FURG. Rio Grande, Rio Grande
17 do Sul, Brazil, Postal Code 96201-900; docpca@furg.br

18 * Author to whom correspondence should be addressed: Federal Institute of Southeastern of Minas
19 Gerais, Câmpus Juiz de Fora – Bernardo Mascarenhas Street, 1283, Fábrica. Juiz de Fora, Minas
20 Gerais, Brazil, Postal Code 36080-001; Tel +55 32 4009 3007; e-mail address:
21 alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br



Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent *in situ* hybridization technique

Alessandro Del'Duca ^{a,*}, Dionéia Evangelista Cesar ^b, Cláudio Galuppo Diniz ^c, Paulo César Abreu ^d

^a Post-Graduation Course on Aquaculture, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, FURG. Rio Grande, Rio Grande do Sul 96201–900, Brazil

^b Departament of Biology, Federal University of Juiz de Fora, UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais 36036–900, Brazil

^c Departament of Parasitology, Microbiology and Immunology. Federal University of Juiz de Fora, UFJF. Juiz de Fora, Minas Gerais 36036–900, Brazil

^d Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, FURG. Rio Grande, Rio Grande do Sul 96201–900, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2013

Received in revised form 15 January 2013

Accepted 16 January 2013

Available online 24 January 2013

Keywords:

Bacillus

Enterococcus

FISH

Probiotic

Pathogenic

ABSTRACT

The Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique was employed to enumerate potential probiotic and putative pathogenic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bacteria used in the study were isolated from water, sediment and intestines of tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in an aquaculture system. These isolates were tested *in vitro* on antagonism tests against putative pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*), also isolated from the same aquaculture system. Two isolates that inhibited largest number of pathogenic bacteria were identified by sequencing as *Bacillus* sp. and *Enterococcus* sp. and were added to the commercial feed (10^6 cells g⁻¹) for *in vivo* tests. Treatments of the *in vivo* experiment were: 1) Control – fish fed with no added bacteria, 2) Bacil. – fish fed diets containing *Bacillus* sp.; 3) Enter. – fish fed diets containing *Enterococcus* sp., and 4) Bacil. + Enter. – fish fed diets containing *Bacillus* sp. and *Enterococcus* sp. (1:1). Each treatment consisted of four replicates with 15 juveniles of tilapia (*O. niloticus* – 16.74 ± 4.35 g e 9.82 ± 0.85 cm). The experiment lasted for 30 days and at the end of this period, three fish from each tank were killed, and the intestines were taken for microbiological analysis by FISH technique, where *Bacillus* and *Enterococcus*, as well as two putative pathogenic bacteria (*Aeromonas* and *Pseudomonas* sp.) were quantified. *Enterococcus* sp. and *Bacillus* sp. were present in high number in the gut microbiota of fish. However, *Bacillus* sp. showed an increase in its abundance, indicating a successful incorporation of this potential probiotic bacteria into the tilapia gut microbiota. Furthermore, in the Bacil. treatment it was observed a significant reduction of *Aeromonas* and *Pseudomonas* sp. abundances compared with the other treatments. These results indicate that the FISH technique is a potential tool to characterize the dynamics of potential probiotic bacteria and their efficiency in the control of pathogenic bacteria.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacterial diseases are responsible for severe economic losses in aquaculture (Wang et al., 2008). The indiscriminate use of antibiotics to control pathogenic microorganisms brings important changes in the microbiota of the aquaculture systems and surrounding environment, creating bacterial resistance to commonly used antimicrobials (Resende et al., 2012) and even affecting natural beneficial bacteria

(He et al., 2010, 2011, 2012). Therefore, it is important to seek and combat these pathogens with the development of alternative methods.

One alternative method for this is the use of microorganisms called probiotics that may restrict the growth of pathogens (Gatesoupe, 1999). Most commercial probiotics used in aquaculture were obtained from terrestrial animals (Nayak, 2010). Thus, aquaculture activity may be introducing exotic bacterial species or strains in aquatic environments, without knowing the consequences of this action. In this sense, there is a need to obtain autochthonous probiotic bacteria, originated from the raised organism or from the environment where they are produced (Aly et al., 2008a; El-Rhman et al., 2009; Jatobá et al., 2008). However, the process of isolation, identification and testing the potential probiotic bacteria is laborious and time consuming (Balcazár et al., 2006; Farzanfar, 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Verschueren et al., 2000b).

* Corresponding author at: Federal Institute of Southeastern of Minas Gerais, Câmpus Juiz de Fora – Bernardo Mascarenhas Street, 1283, Fábrica. Juiz de Fora, Minas Gerais 36080–001, Brazil. Tel.: +55 32 4009 3007.

E-mail addresses: alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br (A. Del'Duca), dioneia.cesar@ufjf.edu.br (D. Evangelista Cesar), claudio.diniz@ufjf.edu.br (C. Galuppo Diniz), docpca@furg.br (P.C. Abreu).

A possible way to evaluate the efficiency of a probiotic candidate is to determine the probiotic and pathogenic bacterial abundances in the fish guts along the time. Many methodologies to count bacteria in fish gut have been developed based on selective growth media (Jatobá et al., 2011; Lallo et al., 2007; Meurer et al., 2007). However, many bacteria do not grow in the culture media normally used (Ray et al., 2010, 2012; Temmerman et al., 2004). The use of culture-independent molecular biology techniques is a more accurate tool to determine the abundance and efficiency of probiotic bacteria (Reid et al., 2006; Ringø et al., 2010). There are various molecular biology techniques that can characterize and quantify the extracted DNA from the bacterial communities. However, the Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique is more effective, since it allows a direct and precise quantification of the pathogenic and probiotic bacterial cells at species or genus level (Merrifield et al., 2010).

The main objective of this study was to test the Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique as a tool to enumerate potential probiotic and putative pathogenic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Furthermore, we want to demonstrate the feasibility in using endemic bacteria, isolated from aquaculture systems, as probiotic for the raised aquatic organisms.

2. Material and methods

2.1. Isolation of potential probiotic bacteria

Bacteria were isolated from the water and sediment of ponds, and from the intestines of 68 tilapias raised in the Fazenda Experimental de Leopoldina/Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (FELP/EPAMIG) between May 2009 and January 2010. Fish for bacterial isolation were randomly sampled in six ponds with an area of 1,200 m² each. Fish were raised at a density of three fish per m². The average weight of the sampled tilapias was 638.8 ± 313.8 g. The fish were fed with commercial diet containing 28% crude protein (Soma ®). The amount of feed offered on a daily basis was ca. 2% of the total fish biomass in the pond. The cultivation system was semi-intensive, with the water flow estimated as 10 L s⁻¹ ha⁻¹, representing a water exchange rate of 6% of the total volume per day.

Water samples (20 mL) were concentrated to 2 mL by centrifugation at 8000 ×g for 10 min at 4 °C. These concentrated samples, 2 g of homogenized sediment and 2 g of homogenized intestine tilapias samples were serially diluted (ten-fold dilutions were prepared to 10⁻⁶) in 0.9% sterile (121 °C for 15 min) saline solution and plated on agar plates of Man, Rugosa and Sharpe (MRS – Difco®) before being incubated in a bacteriological incubator at 35 °C for 24 hours in microaerophilic conditions. After checking the growth, all bacterial colonies were characterized and differentiated by the Gram staining and re-isolated on Petri dishes with Tryptic Soy Agar (TSA – Difco®) to confirm the purity of the isolated bacteria. Subsequently, the pure bacterial isolates were stored in –20 °C in with 10% glycerol solution.

2.2. Selection of potential probiotic bacteria by *in vitro* antagonism

The bacterial isolates were tested by the double-layer method (Booth et al., 1977; Verschueren et al., 2000a) to check its ability to inhibit putative pathogenic bacterial strains. These putative pathogenic bacterial strains were isolated from the same aquaculture environment in previously study (Resende et al., 2012). Potential pathogens used for the *in vitro* tests were *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*.

Search for the potential probiotics was performed with all bacterial isolates obtained from water, sediment and tilapia's gut. They were

cultured in Tryptic Soy Broth (TSB – Difco®) at a density relative to 0.5 MacFarland. Later, they were inoculated with the Steer's replicator on Mueller-Hilton Agar (Difco®) and incubated at 35 °C for 24 hours. After the growth of the colonies, they were killed by exposed to chloroform for 30 minutes. Then, residual chloroform was allowed to evaporate for other 30 minutes. Afterwards, the putative pathogenic bacteria strains were grown in semi-solid tryptic soy medium and added to the plates with potential probiotic bacteria in a double-layer. The plates were immediately incubated at 35 °C for 24 hours. After that, the plates were checked for bacteria growth or inhibition halos, which indicated the antagonistic activity of the potential probiotic bacteria (Booth et al., 1977; Verschueren et al., 2000a).

The two bacterial isolates that inhibited the largest number of selected putative pathogenic strains in the *in vitro* tests were considered as the best candidates for probiotics (Ghosh et al., 2007; Nayak and Mukherjee, 2011) and were identified by genetic sequencing. For this, DNA from these isolated bacteria was extracted using the Fast DNA kit (Qbiogene®) according to the manufacturer's instructions. The DNA fragments were amplified by PCR using general bacterial primers (EUB338f, 5'-ACTCTACGGAGGCAGC-3' (Amann et al., 1990); 926Rr, 5'-CCCGTCAATTCTTTGAGTT-3' (Watanabe et al., 2001); with replicons length of approximately 550 bp. These were cloned and then sequenced by ABI 3730 DNA Analyser. The sequences obtained were compared with those present in the GenBank database using the tool Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide - BLASTN. Sequences showing more than 99% similarity were considered to belong to the same operational taxonomic unit.

2.3. Experimental Design (*in vivo* experiments)

The two potential probiotic bacteria obtained in the *in vitro* tests were then evaluated in *in vivo* experiments. For the *in vivo* tests, 240 tilapia juveniles (16.74 ± 4.35 g and 9.82 ± 0.85 cm) were employed. They were randomly divided into 16 tanks of 1,000 L, composing four treatments (see below), each one with 15 fish per tank.

These tanks are part of the recirculation system water of the FELP/EPAMIG; the water flux was estimated to be approximately 2.8 L per minute. Juveniles tilapias were acclimated for three days before the beginning of the feeding experiment with different diets, as described below. The animals were fed three times a day with their respective diets (see below) in the proportion of 8% of the total biomass of fish in the tank.

2.4. Incorporation of probiotic bacteria candidates in the feed

The potential probiotic bacteria were incorporated into the diet (Jatobá et al., 2008) and offered to juvenile tilapia along the 30 days of the experiment.

For this, the two strains were thawed in TSB after confirmation of the purification of each isolate and were incubated in a bacteriological incubator at 35 °C for 24 hours. When bacterial abundance were 4.5 · 10⁸ cells per mL (direct counting by DAPI staining – Porter and Feig, 1980), the culture was sprayed on a commercial feed containing 36% crude protein (Max Peixe Tropical®). The experiment was composed of four treatments: 1) Control – diet only included sterile TSB; 2) Bacil. – feed was sprayed with *Bacillus* sp. culture; 3) Enter. – feed was sprayed with *Enterococcus* sp. culture; and 4) Bacil. + Enter. – feed was sprayed with *Bacillus* sp. and *Enterococcus* sp cultures in the same proportions (1:1). Subsequently, the different types of feed were placed in a bacteriological incubator at 35 °C for 24 hours. After checking the density of these bacteria in different types of diets (more than 10⁶ specific cells added . g⁻¹). These feeds were stored at 4 °C and their bacterial density remained in the same order of magnitude during all experiment.

2.5. Analysis of potential probiotic and putative pathogenic bacteria by Fluorescent in situ Hybridization (FISH)

After 30 days, three tilapia juveniles from each of the tanks were killed by thermal shock (ice bath for 30 minutes) and necropsied aseptically to remove the intestinal tract. These intestines were fixed in 2% paraformaldehyde (final concentration).

The samples of intestine were processed for analysis by Fluorescent in situ Hybridization (FISH) to identify and quantify four bacterial groups. For this, the samples were treated as described in the protocol proposed by Epstein and Rossel (1995). To each sample, 0.0001% Tween solution was added and then sonicated (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials ®) three times (range 110.7 µm per 60 s). After sonication, the samples were centrifuged at 500 g for five minutes. The supernatant was removed and the remaining contents were washed twice with ultrapure water. The three supernatant fractions were placed in the same bottle and shaken vigorously. The material was then centrifuged as described before. Aliquots of each sample were filtered on polycarbonate filters (Nuclepore® - 0.2 µm) and stored in a refrigerator until the hybridization process.

Subsequently, the samples were subjected to FISH protocol (Cottrell and Kirchman, 2003), where oligonucleotide probes rRNA-targeted were used to identify potential probiotic added to diets (*Bacillus* and *Enterococcus*) and two putative pathogenic bacteria (*Aeromonas* and *P. fluorescens*) (Table 1). A negative control made with a probe without any specificity for bacteria was used to evaluate the efficiency of hybridization. All probes were labeled with the Cy3 fluorochrome. The abundance of bacteria was determined by direct counting at 1000× magnification using an epifluorescence microscope (Olympus® BX-60) equipped with Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 and U-MWG2 optical filter set.

2.6. Statistical analysis

The data were tested for normality. The single criterion variance analysis (ANOVA - one way) and an *a posteriori* Tukey's test were used for normal data and the Kruskal-Wallis test was used for non-normal data using the program SigmaPlot 11.0. In both cases, values of P<0.05 were considered significant (Zar, 1999).

3. Results

3.1. Isolation and identification of potential probiotic bacteria

Seventy-nine bacterial isolates were obtained from all samples. Twenty-three were isolated from the water, 29 from the pond's sediment and 27 from the gut tract of tilapias. Only nine strains presented positive results in the *in vitro* tests (Table 2). Two strains that showed the best performance inhibiting the growth of *A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. fluorescens* and *P. putida*, all gram-negative species (Table 2). These two strains were identified as *Bacillus* sp. and *Enterococcus* sp. Both of the identities of these strains had 99% similarity of 16S rRNA gene sequence compared to the bacteria in GenBank (Table 3). The *Bacillus*

Table 2

In vitro double-layer test results of probiotic bacteria candidates which showed inhibition against pathogenic bacteria used in this research (AH = *Aeromonas hydrophila*; EF = *Enterococcus faecalis*; ET = *Edwardsiella tarda*; PF = *Pseudomonas fluorescens*; PP = *Pseudomonas putida*).

Isolated	Origin	AH	EF	ET	PF	PP
C5S17	Sediment					x
C5S20	Sediment		x			
C5S19	Sediment	x		x	x	x
C1A2	Water					x
C5A25	Water					x
C5A13	Water		x			
C1I3	Gut		x			x
C5I18	Gut	x		x	x	x
C1I6	Gut		x			x

sp. (C5I18) strain was isolated from the intestine of tilapia and *Enterococcus* sp. (C5S19) was isolated from the pond's sediment.

3.2. In vivo tests

The total bacterial abundance in the intestines of fish was significantly higher in the treatments where potential probiotic single or mixed were added compared to the Control (Bacil.: $1.46 \pm 0.15 \cdot 10^7$ cells g^{-1} ; Enter.: $1.65 \pm 0.23 \cdot 10^7$ cells g^{-1} ; Bacil. + Enter.: $1.30 \pm 0.29 \cdot 10^7$ cells g^{-1} ; and Control: $1.17 \pm 0.19 \cdot 10^7$ cells g^{-1}) (Fig. 1).

There were also differences in the intestinal microbiota composition of juvenile tilapias among the treatments. The abundance of *Aeromonas* ($0.21 \pm 0.13 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) and *P. fluorescens* ($0.28 \pm 0.15 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) was significantly lower in the Bacil. treatment compared to the Control ($0.35 \pm 0.17 \cdot 10^6$ cells g^{-1} e $0.51 \pm 0.27 \cdot 10^6$ cells g^{-1} , respectively). Likewise, the abundance of *Pseudomonas fluorescens* ($0.34 \pm 0.15 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) was lower in the Enter. treatment compared to the Control. *Bacillus* abundance was higher in both treatments where this bacteria strain was added (Bacil.: $1.0 \pm 0.47 \cdot 10^6$ cells g^{-1} ; and Bacil. + Enter.: $0.63 \pm 0.18 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) compared to the Control ($0.49 \pm 0.13 \cdot 10^6$ cells g^{-1}). *Enterococcus* abundance ($0.42 \pm 0.15 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) was higher in the treatment where only this bacteria strain was added in comparison with the Control ($0.28 \pm 0.16 \cdot 10^6$ cells g^{-1}). The abundance of *Aeromonas* in Bacil. treatment was also significantly lower than in Enter. treatment ($0.30 \pm 0.08 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) and in Bacil. + Enter. treatment ($0.34 \pm 0.12 \cdot 10^6$ cells g^{-1}) (Fig. 2).

4. Discussion

We cannot deny the success of commercial probiotics used in aquaculture. However, allochthonous probiotics often have not presented great viability, since the survival rates of these microorganisms are often low (Gatesoupe, 2008). There is a consensus that endemic probiotics are more likely to settle in the cultivated animals, probably due to their ability to easier adapt to the environment being, therefore, a preferential organism to be searched and isolated

Table 1

rRNA-targeted oligonucleotide probes of different bacterial species used in this research. All probes were labeled with fluorochrome Cy3.

Probe	Specificity	Sequence (5' - 3')	Target site (rRNA positions)	% FA*	Reference
NON	Negative Control	TAGTGACGCCGTGA	-	30	Yokokawa and Nagata, 2005
Bacil 1	<i>Bacillus</i>	GCCGCCCTTCAATTTCGAA	195–209	35	Ichijo et al., 2010
Enter 2	<i>Enterococcus</i>	TCCATCAGCGACACCCGAAA	202–221	35	Demanèche et al., 2008
Aero 2	<i>Aeromonas</i>	GTAACGTCACAGCCAGCAGA	468–487	35	Kyselková et al., 2009
PsAg1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GATAACTCGTCATCAGCTC	1520–1538	30	Boye et al., 1995

* Percentage of formamide (FA) in *in situ* hybridization buffer.

Table 3

Characteristics of the colonies, cells morphology, and comparison with samples available in GenBank of bacterial isolates sequenced and used in *in vivo* tests.

Isolated	Morphology of bacterial cells	Characteristics of bacterial colonies	Number of base pairs (bp)	Bacterial taxa more approximate in GenBank	Similarity (%)
C5S19	Gram positive cocci	White, bright and with regular edge	302	<i>Enterococcus</i> sp.	99
C5I18	Gram positive rod	Slightly yellowish, opaque and with irregular edge	300	<i>Bacillus</i> sp.	99

for further applications as probiotics (Balcázar et al., 2007; Carnevali et al., 2004).

The procedures to obtain probiotic bacteria are quite strict regarding various aspects to provide security to the final consumers. Isolating bacteria, testing *in vitro* and *in vivo* to verify the action of these isolates, and testing the pathogenicity in the target organisms and in others organisms involved in the food chain are just some of the steps that must be followed to obtain a commercial probiotic (Merrifield et al., 2010; Verschueren et al., 2000b). These authors suggest that monitoring the microbiota before and after the probiotic addition is also important to determine the efficiency and the changes that occur in the bacterial community by the administration of probiotic bacteria.

Some researchers have evaluated the efficiency of potential probiotic bacteria by utilizing cultivation-dependent techniques for counting probiotic and pathogenic bacteria that were introduced (Avella et al., 2010, 2011; Balcázar et al., 2007; Gopalakannan and Arul, 2011; Merrifield et al., 2009; Nayak and Mukherjee, 2011). Other studies have evaluated the efficiency of probiotic bacteria through indirect indicators, such as hematological parameters and growth performance of raised animals (Al-Dohail et al., 2009; Avella et al., 2010; Balcázar et al., 2007; Brunt and Austin, 2005; El-Dakar et al., 2007; Merrifield et al., 2009; Nayak and Mukherjee, 2011). Nevertheless, there is still little information on the effective colonization of administered probiotics and their interaction with pathogens (Merrifield et al., 2010).

Molecular biology techniques are important tools for performing more accurate monitoring of the added bacteria and also the control of pathogenic bacteria (Merrifield et al., 2010; Verschueren et al., 2000b). Sun et al. (2011) showed no significant changes in the bacterial community using the technique of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) after the addition of the probiotic. One possible explanation for this is that this technique allows identifying the

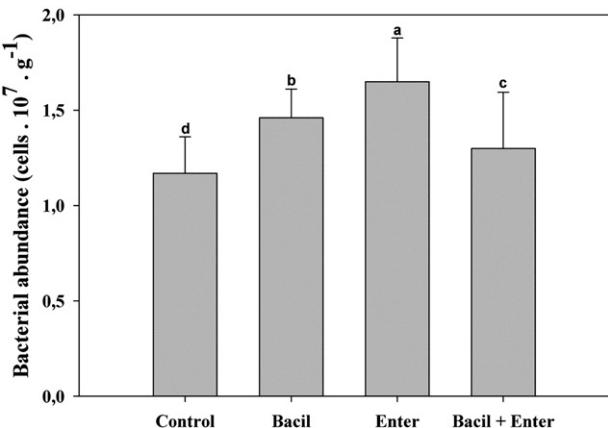


Fig. 1. Total bacterial abundance ($\text{cells} \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$) in fish gut at Control, Bacil., Enter. and Bacil. + Enter. treatments. Different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

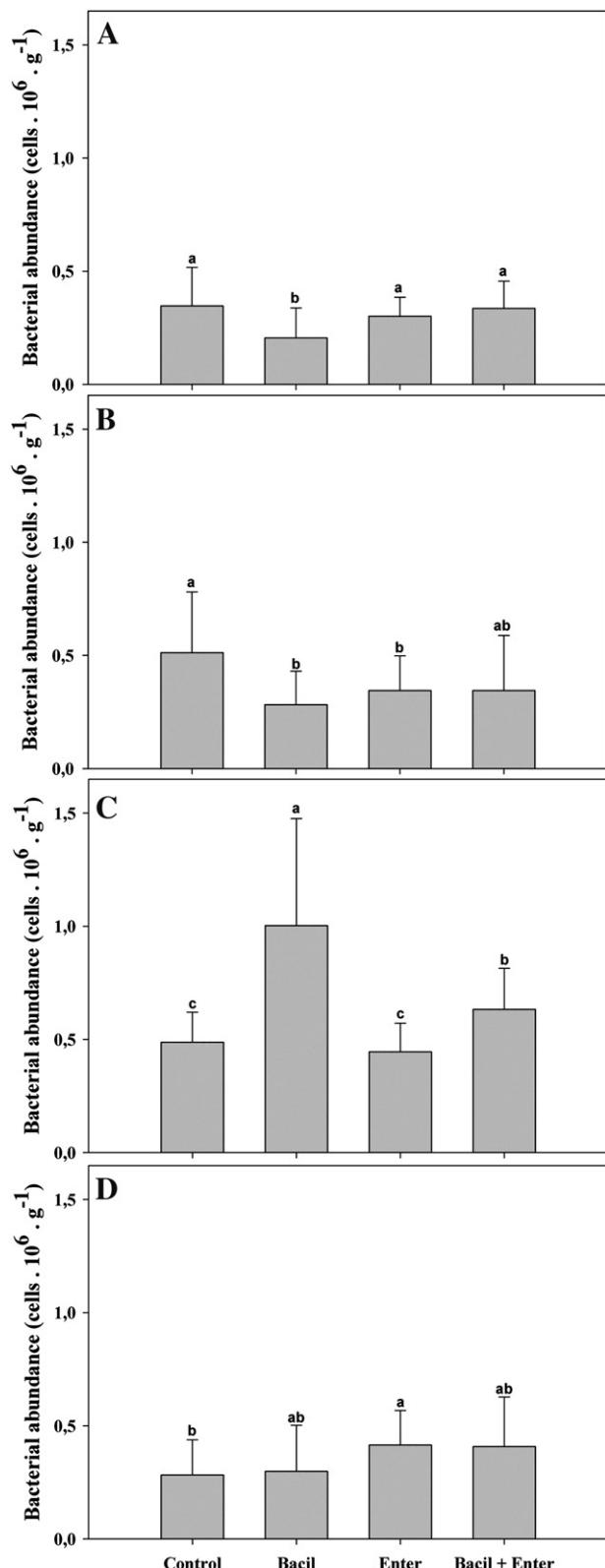


Fig. 2. Specific bacterial abundance ($\text{cells} \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$) of *Aeromonas* (A), *Pseudomonas fluorescens* (B), *Bacillus* (C) and *Enterococcus* (D) in fish gut at Control, Bacil., Enter. and Bacil. + Enter. treatments. Different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

presence of microorganisms in any amount due to the amplification of DNA. The results of the DGGE are visualized through the bands of amplified nucleic acid in the gel and it is proportional to the amount of individuals. However, variations in the intensity and size of bands

can occur and do not permit precise quantification of the number of individuals in the sample. Therefore, in our work, we proposed to use another molecular biology technique, the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique. FISH is a culture-independent molecular technique that allows visualization and direct counting of bacterial cells specifically labeled. It is based on the use of fluorescent probes that are specific for bacterial groups, genera or species (Zwirglmaier, 2005). Through the FISH technique, we can quantify and follow changes in the number of probiotics and pathogens microorganisms. Thus, the microbial community structure (taxa and number of each taxa of bacteria) allows us to verify the probiotic efficiency.

In aquaculture, FISH technique has been used to characterize the microbiota of water and wastewater (Garcia and Olmos, 2007; Paungfoo et al., 2007; Payne et al., 2007; Pereira et al., 2011), the formation of biofilm (Cytyn et al., 2006), the microbiota of the intestinal tract of fish (Asfie et al., 2003; Balcázar et al., 2010; Huber et al., 2004).

The two strains of potential probiotic bacteria isolated in our study were identified as *Bacillus* sp. and *Enterococcus* sp. Species of these same genera are already used as probiotic in aquaculture (Kumar et al., 2006). However, in our study, the *Bacillus* sp. had a better performance in comparison to the other treatments, always showing abundances in the tilapia intestine tract nearly twice that of *Enterococcus* sp. at the end of the experiment.

Even though results of other *in vitro* (Chau et al., 2011; Shakibazadeh et al., 2012; Sica et al., 2010, 2012; You et al., 2005) and *in vivo* tests (Ravi et al., 2007) showed the potential of probiotic of bacteria isolated from pond's sediment, the better performance of *Bacillus* sp. in this work, may be related to the fact that this strain has been isolated from the gut of tilapia. It probably facilitates the incorporation and colonization of this strain when offered together with commercial feed.

Aeromonas and *P. fluorescens* are normally found in the intestine of tilapia (He et al., 2009), being a major route of infection in fish. The control *Aeromonas* population is of paramount importance, since some species of this genus, such as *A. hydrophila*, are highly pathogenic to fish (Aly et al., 2008a; Li and Cai, 2011). Similarly, *Pseudomonas* species are important pathogens in fish (Zhang et al., 2009), although some species were tested as probiotic (El-Rhman et al., 2009). Therefore, these bacterial species should be monitored and controlled to avoid further opportunistic infections.

The probiotic action of *Bacillus* species has been already demonstrated in several studies with different species of raised aquatic organisms. In studies with tilapia, for example, *Bacillus* increased resistance and survival when exposed to *Aeromonas* and *Pseudomonas* (Aly et al., 2008a, 2008b). The fish presented an increase in the phagocytic activity of leukocytes (Aly et al., 2008c) and better immune response (Ridha and Azad, 2012). Similar effects were observed for several other fish species (Avella et al., 2010; Brunt et al., 2007; Kumar et al., 2006; Newaj-Fyzul et al., 2007; Raida et al., 2003; Sugita et al., 1998) and shrimps (Balcázar and Rojas-Luna, 2007; Rengpipat et al., 2003; Vaseeharan and Ramasamy, 2003). In general, the use of *Bacillus* species as probiotic increases the animal's resistance to bacterial diseases and, consequently, their survival.

In our results, we observed the efficient action of *Bacillus* sp. in the control of *Aeromonas* and *Pseudomonas* populations in both *in vitro* and *in vivo* tests. The gut of tilapias was colonized by *Bacillus* sp. The number of cells of *Bacillus* sp. increased, while there was a reduction of putative pathogens in juveniles of tilapia. However, other subsequent tests must be performed to confirm the probiotic action of these strains, following the suggestions of Verschueren et al. (2000b) to obtain efficient probiotic species.

In summary we can conclude that the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique is an excellent tool for monitoring potential probiotic, putative pathogenic, or any other kind of bacteria present in the fish gut content. This technique can be employed in any research where direct visualization of bacteria is necessary in order

to better understand physiological and metabolic processes. In this study the use of FISH allowed to demonstrate that the strain of *Bacillus* sp., an endemic bacteria isolated from the tilapia gut, showed efficient residence in the fish intestine tract and a good control of putative pathogenic bacteria populations (*Aeromonas* and *Pseudomonas fluorescens*) also isolated from the same aquaculture system.

Acknowledgements

We thank the Empresa de Pesquisa Agropecuária of Minas Gerais (EPAMIG), especially Thiago Freato, for the support provided at the Fazenda Experimental de Leopoldina (FELP/EPAMIG); Thiago Nascimento, Juliana Resende and Cláudia Fontes for help in the bacterial antagonism *in vitro* assay; Cintia Coelho and Juliiane Medeiros for help in bacterial DNA extraction and analysis; Edmo Rodrigues and Raiza Azevedo for help in processing samples for analysis by FISH. Financial support and grants consent by CNPq (Process 145337/2009-0).

References

- Al-Dohail, M., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M., 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, hematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research* 40, 1642–1652.
- Aly, S., Abd-El-Rahman, A., John, G., Mohamed, M., 2008a. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotic. *Aquaculture* 277, 1–6.
- Aly, S., Ahmed, Y., Ghareeb, A., Mohamed, M., 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 128–136.
- Aly, S., Mohamed, M., John, G., 2008c. Effect of probiotic on the survival, growth and challenge infection in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 39, 647–656.
- Amann, R., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devereux, R., Stahl, D., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919–1925.
- Asfie, M., Yoshijima, T., Sugita, H., 2003. Characterization of the goldfish fecal microbiota by the fluorescent *in situ* hybridization method. *Fisheries Science* 69, 21–26.
- Avella, M., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C., Carnevali, O., 2010. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture* 305, 12–19.
- Avella, M., Olivotto, I., Silvi, S., Ribecco, C., Cresci, A., Palermo, F., Polzonetti, A., Carnevali, O., 2011. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture* 315, 384–393.
- Balcázar, J., Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology* 55, 409–412.
- Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J., 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173–186.
- Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Clavo, A., Márquez, I., Gironés, O., Múzquiz, J., 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition* 98, 522–527.
- Balcázar, J., Lee, N., Pintado, J., Planas, M., 2010. Phylogenetic characterization and *in situ* detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*) in captivity. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 71–77.
- Booth, S., Johnson, J., Wilkins, T., 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11, 718–724.
- Boye, M., Ahl, T., Molin, S., 1995. Application of a strain-specific rRNA oligonucleotide probe targeting *Pseudomonas fluorescens* Ag1 in a mesocosm study of bacterial release into the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1384–1390.
- Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 28, 693–701.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 30, 573–579.
- Carnevali, O., Zamponi, M., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A., Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 12, 377–386.
- Chau, N., Hieu, N., Thuan, L., Matsumoto, M., Miyajima, I., 2011. Identification and characterization of Actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. isolated from shrimp culture pond sediments in Thua Thien Hue-Viet Nam. *Journal of the Faculty of Agriculture* 56, 15–22.

- Cottrell, M., Kirchman, D., 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. Limnology and Oceanography 48, 168–178.
- Cytryn, E., Minz, D., Gieseke, A., Rijn, J., 2006. Transient development of filamentous *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiology Letters 256, 22–29.
- Demanèche, S., Sanguin, H., Poté, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T., Simonet, P., 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant field. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 3957–3962.
- El-Dakar, A., Shalaby, S., Saoud, I., 2007. Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. Aquaculture Nutrition 13, 407–412.
- El-Rhman, A., Khattab, Y., Shalaby, A., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotic for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology 27, 175–180.
- Epstein, S., Rossel, J., 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. Marine Ecology Progress Series 117, 289–298.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology and Medical Microbiology 48, 149–158.
- Garcia, A., Olmos, J., 2007. Quantification by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery. Aquaculture 262, 211–218.
- Gatesoupe, F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165.
- Gatesoupe, F., 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 14, 107–114.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2007. Isolation of putative probiotics from the intestines of Indian major carps. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 59, 127–132.
- Gopalakkannan, A., Arul, V., 2011. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture International. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-011-9415-2>.
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., Shi, P., Yao, B., Ringø, E., Yoon, I., 2009. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) cultured in cages. Aquaculture 294, 99–107.
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., Cao, Y., Meng, K., Shi, P., Yao, B., Ringø, E., 2010. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). Archives of Microbiology 192, 985–994.
- He, S., Zhou, Z., Meng, K., Zhao, H., Yao, B., Ringø, E., Yoon, I., 2011. Effects of dietary anti-biotic growth promoter and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on production, intestinal bacterial community, and nonspecific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* female × *Oreochromis aureus* male). Journal of Animal Science 89, 84–92.
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., Cao, Y., Meng, K., Shi, P., Yao, B., Ringø, E., 2012. Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)? World Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 785–791.
- Huber, I., Spangard, K., Appel, K., Rossen, L., Nielsen, T., Gram, L., 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology 96, 117–132.
- Ichijo, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M., 2010. Oligonucleotide probes for phylogenetic detection of waterborne bacteria. Journal of Health Science 56, 321–325.
- Jatobá, A., Vieira, F., Buglione-Neto, C., Silva, B., Mourão, J., Jerônimo, G., Dotta, G., Martins, M., 2008. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43, 1201–1207.
- Jatobá, A., Vieira, F., Buglione-Neto, C., Mourão, J., Silva, B., Seifert, W., Andreatta, E., 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. Fish Physiology and Biochemistry 37, 725–732.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274, 1–14.
- Kumar, R., Mukherjee, S., Prasad, K., Pal, A., 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research 37, 1215–1221.
- Kyselková, M., Kopecký, J., Frapolí, M., Défago, G., Ságová-Marecková, M., Grundmann, G., Moënne-Loccoz, Y., 2009. Comparaison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conductive to tobacco black root rot disease. ISME Journal 3, 1127–1138.
- Lallo, R., Ramchurian, S., Ramduth, D., Görgens, J., Gardiner, N., 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology 103, 1471–1479.
- Li, Y., Cai, S.-H., 2011. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tral-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Current Microbiology 62, 623–627.
- Merrifield, D., Bradley, G., Baker, R., Davies, S., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post-antibiotic treatment. Aquaculture Nutrition. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x>.
- Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, J., Baker, R., Bøgwald, J., Castex, M., Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302, 1–18.
- Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M., Freccia, A., Mauerwerk, V., 2007. *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic for Nile tilapia fingerlings submitted to a sanitary challenge. Revista Brasileira de Zootecnia 36, 1219–1224.
- Nayak, S., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & Shellfish Immunology 29, 2–14.
- Nayak, S., Mukherjee, S., 2011. Screening of gastrointestinal bacteria of Indian major carps for a candidate probiotic species for aquaculture practices. Aquaculture Research 42, 1034–1041.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A., Mutani, A., Ramsuhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology 103, 1699–1706.
- Paungfoo, C., Prasertsan, C., Burrell, P., 2007. Nitrifying bacterial communities in an aquaculture wastewater treatment system using fluorescence *in situ* hybridization (FISH), 16S rRNA gene cloning, and phylogenetic analysis. Biotechnology and Bioengineering 97, 985–990.
- Payne, M., Hall, M., Sly, L., Bourne, D., 2007. Microbial diversity within early-stage cultured *Panulirus ornatus* Phyllosomas. Applied and Environmental Microbiology 73, 1940–1951.
- Pereira, C., Salvador, S., Arrojado, C., Silva, Y., Santos, A., Cunha, A., Newton Gomesand, N., Almeida, A., 2011. Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy. Journal of Environmental Monitoring 13, 1053–1058.
- Porter, K.S., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnology and Oceanography 25, 943–948.
- Raida, M., Larsen, J., Nielsen, M., Buchmann, K., 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). Journal of Fish Diseases 26, 495–498.
- Ravi, A., Musthafa, K., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandin, S., 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. Letters in Applied Microbiology 45, 219–223.
- Ray, A., Roy, T., Mondal, S., Ringø, E., 2010. Identification of gut-associated amylase, cellulose and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. Aquaculture Research 41, 1462–1469.
- Ray, A., Ghosh, K., Ringø, E., 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquaculture Nutrition 18, 465–492.
- Reid, G., Kim, S., Köhler, G., 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. FEMS Immunology and Medical Microbiology 46, 149–157.
- Rengpipat, S., Tunyaun, A., Fast, A., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. Diseases of Aquatic Organisms 55, 169–173.
- Resende, J., Silva, V., Fontes, C., Souza-Filho, J., Oliveira, T., Coelho, C., Cesar, D., Diniz, C., 2012. Multidrug-resistance and toxic metals tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. Environmental Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1264/jsm2.ME12049>.
- Ridha, M., Azad, I., 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquaculture Research 43, 843–852.
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R., Mayhew, T., 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. Aquaculture Research 41, 451–467.
- Shakibazadeh, S., Saad, R., Hafezieh, M., Christianus, A., Saleh, M., Sijam, K., 2012. A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 11, 849–866.
- Sica, M., Oliveira, N., Brugnoni, L., Marucci, P., Cazorla, A., Cubitto, M., 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca estuary. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45, 389–397.
- Sica, M., Brugnoni, L., Marucci, P., Cubitto, M., 2012. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. Antonie Van Leeuwenhoek 101, 869–879.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y., 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture 165, 269–280.
- Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L., Song, K., Lin, W.-Y., 2011. Molecular analysis of autochthonous microbiota along the digestive tract of juvenile grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus pumilus* administration. Journal of Applied Microbiology 110, 1093–1103.
- Temmerman, R., Huys, G., Swings, J., 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science & Technology 15, 348–359.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology 36, 83–87.
- Verschueren, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000a. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. Applied and Environmental Microbiology 66, 1139–1146.
- Verschueren, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000b. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 655–671.
- Wang, Y.-B., Li, J.-R., Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. Aquaculture 281, 1–4.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Harayama, S., 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. Journal of Microbiological Methods 44, 253–262.
- Yokokawa, T., Nagata, T., 2005. Growth and grazing mortality rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. Applied and Environmental Microbiology 71, 6799–6807.

- You, J., Cao, L., Liu, G., Zhou, S., Tan, H., Lin, Y., 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 679–682.
- Zar, J., 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall Publisher, Upper Saddle River, USA.
- Zhang, W.-w., Hu, Y.-h., Wang, H.-l., Sun, L., 2009. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. Veterinary Microbiology 139, 183–188.
- Zwirglmaier, K., 2005. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) — the next generation. FEMS Microbiology Letters 246, 151–158.