

Avaliação não invasiva indireta para determinação da colonização probiótica intestinal em peixes

Peterson Emmanuel Guimarães Paixão¹, Natalino da Costa Sousa², Márcia Valéria Silva do Couto³, Higo Andrade Abe⁴, Joel Artur Rodrigues Dias⁵, Juliana Oliveira Meneses⁶, Fernanda dos Santos Cunha⁷, Alexandre Nizio Maria⁸, Paulo Cesar Falange Carneiro⁹, Ricardo Coelho de Sousa¹⁰, Jéssica Queiroz Pardo¹¹, João Carlos Nunes de Souza¹², Rodrigo Yudi Fujimoto¹³

Resumo - A eutanásia é um método que precisa ser realizado para a quantificação probiótica intestinal. Novas metodologias precisam ser desenvolvidas para reduzir essa prática. Assim, um método indireto como coleta de fezes para essa avaliação de colonização probiótica pode ser uma alternativa. Pensando nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar indiretamente a colonização probiótica intestinal pela quantificação das bactérias probióticas nas fezes, assim como avaliar o desempenho zootécnico dos peixes submetidos à suplementação. Para tanto, 120 juvenis de acará bandeiras foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições (controle, dietas suplementadas com 10^4 UFC, 10^6 UFC e 10^8 UFC de *Enterococcus faecium*/g de ração). Os animais foram alimentados durante 90 dias e a cada 30 dias foram realizadas as biometrias e a coleta de fezes, assim como eutanásia de uma amostra de peixes, para a quantificação probiótica intestinal para as correlações estatísticas. A bactéria probiótica proporcionou melhora no desempenho produtivo nas concentrações de 10^6 UFC e 10^8 UFC de *E. faecium*/g de ração, que representaram uma concentração intestinal, ao final de 90 dias, de 5×10^5 UFC e 6×10^6 UFC de *E. faecium*/g de intestino, porém não foi possível determinar um fator de correção entre a quantificação das bactérias nas fezes e a quantidade de bactérias no intestino, impossibilitando um método indireto de determinação de colonização. Assim apesar do melhor desempenho zootécnico, a eutanásia ainda se mostra a metodologia de maior acurácia para determinar a quantidade de bactérias probióticas. Porém novas metodologias devem ser incentivadas para reduzir a prática da eutanásia para essa quantificação probiótica.

Termos para indexação: probiótico, método indireto, fezes, colonização.

Introdução

Os probióticos são microrganismos que colonizam o trato intestinal dos animais proporcionando uma modulação da microbiota com consequente melhora na absorção de nutrientes, competição com bactérias patogênicas e melhora imunológica do seu hospedeiro (Mouriño et al., 2017).

O uso de probióticos na aquicultura está em franco desenvolvimento, encontrando-se probióticos para algumas espécies de peixes (Farias et al., 2016; Mehdinejad et al., 2018). Porém, uma das dificuldades para averiguar a presença do probiótico nos animais, é devido à necessidade da eutanásia do peixe para coleta do trato gastrointestinal, que possibilita o reisolamento e a quantificação dessa bactéria probiótica. Esse tipo de procedimento não poderia ser utilizado, por exemplo, em animais reprodutores já que esses são os responsáveis pela produção de formas jovens que subsidiam a produção. Assim, metodologias que possibilitem a avaliação da quantidade de probiótico nos peixes após suplementação na dieta sem a eutanásia dos animais é uma questão importante tanto do ponto de vista produtivo quanto de ética animal.

Dentre as espécies de peixes de importância econômica estão os ornamentais que embora não produzam alimento per se, produzem recursos financeiros que possibilitam as famílias usufruírem de uma melhora na qualidade de vida (Assis et al., 2014). Entre as espécies ornamentais destaca-se o acará bandeira (*Pterophyllum scalare*), muito apreciada pelos consumidores devido ao seu formato, docilidade, cores e facilidade de manutenção em cativeiro (Ribeiro et al., 2012). Neste cenário, não há estudos sobre a avaliação de uma metodologia indireta de avaliação de colonização de bactérias probiótica em acará bandeira. Assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a quantificação bacteriana indireta nas fezes a fim de impedir a eutanásia dos animais para tal propósito, assim como o efeito da suplementação de uma bactéria probiótica autóctone no desempenho produtivo de acará bandeira.

¹Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁴Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁷Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁸Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁹Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹⁰Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹¹Gruaduada em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹²Gruaduada em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹³Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Material e métodos

A bactéria probiótica foi isolada do trato digestório de dez juvenis saudáveis de *P. scalare* ($2,2\pm 0,17$ cm e $0,77\pm 0,15$ g) submetidos a jejum de 24 horas para esvaziamento intestinal. Os peixes foram eutanasiados (CEUA N° 03.13.09.015.00.00) e o intestino anterior coletado, sendo então macerado em solução salina (2% de NaCl) e transferido para tubos *Falcon* contendo meio de cultura em caldo (1:10), Man Rogosa Sharpe (MRS), homogeneizado com agitador de tubos vórtex e incubados por 24 horas a 35 °C. Após crescimento bacteriano, foi realizada a cultura em placa de Petri de acordo com Ramirez et al. (2006) e então identificada geneticamente como *Enterococcus faecium*.

Para o preparo da ração, a cepa da bactéria ácido-láctica de *E. faecium* foi crescida em meio de cultura caldo MRS, sendo homogeneizada e incubada, como descrito acima, em recipientes vedados de acordo com a concentração desejada para cada tratamento. Foi feita aspersão na ração na proporção de 100 mL/Kg, seguindo a metodologia de Jatobá et al. (2015). A ração comercial utilizada apresentava a seguinte composição bromatológica: Umidade 15%; Proteína bruta 39,5%; Extrato etéreo 6,5%; Fibra bruta 2,5%; Material mineral 8,5%, Cálcio 2,8% e Fósforo 5,3%.

Foram utilizados 120 espécimes de juvenis saudáveis de *P. scalare* (comprimento padrão de $3,4\pm 0,5$ cm e peso de $1,68\pm 0,4$ g). Os peixes foram alocados em 12 aquários (10 indivíduos por recipiente) em delineamento inteiramente casualizado constituído por quatro tratamentos: ração comercial aspergida com 10^4 UFC, 10^6 UFC e 10^8 UFC de *E. faecium*/g de ração comercial (T1, T2 e T3, respectivamente) e ração comercial sem a adição da bactéria probiótica (controle). Foram realizadas três repetições de cada tratamento durante período experimental de 90 dias. As dietas experimentais foram fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia (8h e 17 h). O experimento foi realizado em aquários com 90 L de água em sistema de recirculação e aeração constante individualizada. Durante o período experimental, os valores físicos e químicos da água mantiveram-se em temperatura de $28,6\pm 0,28$ °C, oxigênio dissolvido de $5,78\pm 0,34$ mg/L, pH de $7,62\pm 0,30$ e condutividade elétrica de $368\pm 32,12$ µS/cm.

A cada 30 dias, após alimentação, o aquário era limpo e então se aguardava o momento de trânsito das fezes para a sua coleta, esta era destinada para quantificação das bactérias probióticas. Posteriormente, os animais eram retirados dos aquários, anestesiados com eugenol (60 mg/L) e então pesados e medidos para determinação dos parâmetros de desempenho zootécnico (ganho em peso - GP = peso final - peso inicial; taxa de crescimento específico - TCE = $100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{número de dias}]$; uniformidade do lote-Up (Furuya et al., 1998); fator de condição relativo-Kr (Le Cren, 1951), sobrevivência -S= [número final de animais/número inicial de animais*100] e conversão alimentar aparente - CAA = consumo de ração/ganho de peso.

Para a análise microbiológica, no mesmo momento da biometria nove peixes de cada tratamento foram eutanasiados, por aprofundamento anestésico seguido de seção medular, para avaliar as possíveis alterações nas concentrações de microrganismo probiótico no trato gastrointestinal dos peixes submetidos aos tratamentos e o grupo controle. As porções de fezes e o intestino médio foram pesadas e maceradas em gral e pistilo na proporção peso/volume com solução salina estéril a 0,65%, para posterior diluição seriada 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} com fator 1:10 em tubos de ensaio.

Posteriormente, uma alíquota de 100 µl de cada diluição foi semeada em placas de petri contendo o meio de cultura seletivo MRS, para avaliação do crescimento das bactérias ácido-láticas. Estas placas foram então incubadas a 35 °C por 48 horas (Mourião et al., 2017).

Os valores de desempenho foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) em cada período experimental e o teste de Tukey para a comparação das médias. As contagens microbiológicas foram transformadas em $\log(x+1)$, antes de serem submetidas aos testes estatísticos. Os dados de quantificação microbiológica das fezes e do intestino foram submetidas a correlação de Pearson e posteriormente a estimação da regressão não linear.

Resultado e Discussão

Os peixes suplementados com dietas contendo concentrações de 10^6 UFC e 10^8 UFC de *E. faecium*/g de ração, tiveram aumento no ganho de peso ($1,41\pm 0,08$ g e $1,54\pm 0,10$ g), taxa de crescimento específico para peso ($2,07\pm 0,10\%$ e $2,15\pm 0,14\%$), uniformidade do lote ($93,33\pm 11,54\%$ e $93,33\pm 11,54\%$) e menor conversão alimentar aparente ($1,82\pm 0,02$ e $1,76\pm 0,04$) durante os primeiros 30 dias. Nos 60 e 90 dias estes dois tratamentos apresentaram apenas melhora no ganho de peso e conversão alimentar (Tabela 1), não sendo observada diferença para a sobrevivência ao longo do experimento.

Em *Labeo rohita* e *Astyanax bimaculatus* também houve melhora nos parâmetros de desempenho zootécnico quando alimentados com bactéria probiótica autóctone (Giri et al., 2013; Moraes et al., 2018). O uso de probiótico autóctone favorece a colonização no trato intestinal, possibilitando o aumento das vilosidades e promovendo a melhoria na absorção de nutrientes contidos na ração, podendo contribuir para o incremento de peso final (Verschuere et al., 2000; Merrifield et al., 2010; Ringo et al., 2010; Jatobá et al., 2017). Essa colonização intestinal foi verificada durante o experimento com aumento da quantidade de bactérias probiótica no

decorrer do período experimental sendo que a partir dos 60 dias a concentração probiótica alcançou valores de 10^4 UFC/g, 10^5 UFC/g e 10^6 UFC/g de intestino e permaneceram nesse patamar até o final do experimento (Tabela 2). Essa interação entre o hospedeiro e a bactéria probiótica são importantes para determinar a comunidade microbiana intestinal (Zoetendeal et al., 2002), sendo assim microrganismos espécie-específicos melhores para esse fim probiótico.

Tabela 1. Desempenho produtivo e sobrevivência (média±desvio padrão) dos juvenis de *P. scalare* alimentados com rações de diferentes concentrações do probiótico *Enterococcus faecium*, durante 90 dias experimentais.

	GP (g)	TCEp (%)	U (%)	Kr	S (%)	CAA
30 dias						
C	1,14±0,05 b	1,70±0,06 b	53,3±12,64 b	0,99±0,05 a	100 a	2,11±0,02 c
T1	1,35±0,09 ab	1,96±0,12 ab	73,3±11,54 ab	1,01±0,02 a	100 a	1,98±0,04 b
T2	1,41±0,08 a	2,07±0,10 a	93,33±11,54 a	0,99±0,06 a	100 a	1,82±0,02 a
T3	1,54±0,10 a	2,15±0,14 a	93,33±11,54 a	1,04±0,04 a	100 a	1,76±0,04 a
60 dias						
C	2,31±0,21 b	1,98±0,15 a	100 a	1,03±0,05 a	100 a	1,87±0,01b
T1	2,45±0,33 b	1,96±0,22 a	100 a	0,98±0,02 a	100 a	1,91±0,07b
T2	3,05±0,19 a	2,30±0,13 a	100 a	1,02±0,02 a	100 a	1,47±0,14 a
T3	3,14±0,11 a	2,20±0,14 a	100 a	1,00±0,06 a	100 a	1,52±0,10 a
90 dias						
C	2,70±0,34 b	1,40±0,17 a	100 a	0,99±0,01 a	100 a	1,79±0,04 b
T1	2,90±0,35 b	1,41±0,18 a	100 a	1,01±0,02 a	100 a	1,81±0,08 b
T2	3,96±0,39 a	1,66±0,16 a	100 a	1,02±0,01 a	100 a	1,50±0,04 a
T3	3,92±0,43 a	1,61±0,14 a	100 a	1,04±0,03 a	100 a	1,52±0,05 a

Os valores nas colunas com letras diferentes diferenciam estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$). GP (ganho de peso), TCEp (taxa de crescimento específico para peso), U (Uniformidade), Kr (Fator de condição relativo), S (sobrevivência) e CAA (conversão alimentar aparente). Grupo controle (C), Peixes alimentados com dietas contendo concentrações de 10^4 (T1), 10^6 (T2) e 10^8 (T3) UFC de *E. faecium*/g de ração.

Estudos utilizando a bactéria probiótica autóctone *E. faecium* em peixes ornamentais são escassos. Já em espécies para corte como tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), truta (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) e linguado (*Paralichthys olivaceus* Temminck e Schlegel, 1846) suplementados com *E. faecium* foi possível observar que além de melhor desempenho zootécnico (ganho de peso e conversão alimentar) a suplementação promoveu melhora no sistema imunológico (Merrifield et al., 2010; Kim et al., 2012; Moraes et al., 2018). Para o acará bandeira também se observou melhora na reprodução quando foram alimentados com ração suplementada com *E. faecium* (Hollatz, 2015)

Com relação ao probiótico nas fezes, observou-se que houve um aumento gradativo em relação ao tempo de suplementação (Tabela 2), mostrando que a partir dos 60 dias a concentração de probióticos nas fezes no T1 e T2 foi semelhante à encontrada no intestino. Já no tratamento T3 observou-se que a semelhança somente foi alcançada aos 90 dias de experimento. Essa semelhança entre a quantidade encontrada nas fezes e no intestino pode ser decorrente tanto pelo fato do excesso de bactéria da dieta, que por não colonizar o intestino, é liberada nas fezes, quanto pela modificação do microambiente intestinal no decorrer da passagem do bolo fecal pelo intestino, pois esse microambiente varia do intestino anterior ao reto (Marteau et al., 2001). Pelos resultados apresentados existe uma correlação entre a concentração probiótica nas fezes e a concentração probiótica no intestino (Pearson $r^2=0,81$ $p=0,0013$). Após transformação logarítmica dos dados para linearização e consequente obtenção de regressão linear, observou-se que apesar de significativa ($p=0,0005$), apresenta um baixo coeficiente de determinação ($R^2=0,71$) que impossibilitou uma determinação com acurácia da concentração probiótica do intestino a partir das fezes.

Tabela 2. Concentração probiótica no intestino e fezes dos peixes no decorrer do período experimental suplementados com *E. faecium*

	Controle		T1		T2		T3	
	fezes	peixe	Fezes	peixe	fezes	peixe	fezes	peixe
30 dias	0	0	2×10^3	3×10^3	4×10^5	5×10^4	6×10^5	5×10^6
60 dias	0	0	2×10^4	2×10^4	5×10^5	5×10^5	9.5×10^5	5×10^6
90 dias	0	0	2×10^4	1×10^4	5×10^5	5×10^5	$1. \times 10^6$	6×10^6

*Concentração probiótica em UFC/g (de fezes ou intestino)

Considerando-se um ajustamento da curva de regressão para uma equação não linear, observou-se que para os dados do presente trabalho, a regressão exponencial apresentou maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,89$ Figura 1), porém devido aos altos valores em escala exponencial, um maior coeficiente de determinação, acima de $R^2 = 0,95$ seria mais adequado para confirmar a estimativa da concentração probiótica intestinal.

Assim, ainda não há como determinar com acurácia a concentração probiótica intestinal pela análise das fezes o que inviabilizou a determinação de um fator de correção. Porém, havendo a suplementação durante 90 dias, pode-se conseguir estimar a quantidade de bactérias no intestino pelas fezes, mas novos estudos devem ser realizados para comprovar a estabilidade da quantidade probiótica além desses 90 dias para garantir essa estimativa.

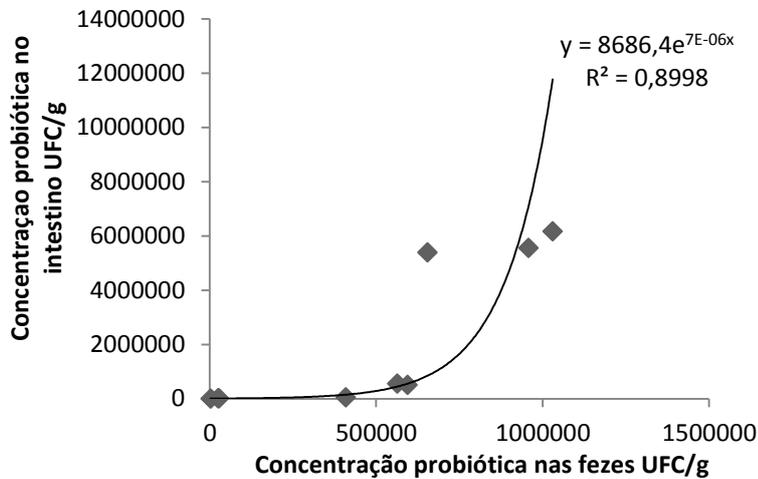


Figura 1. Relação concentração probiótica nas fezes e no intestino, equação e coeficiente de determinação da regressão exponencial para o ajustamento da curva entre a concentração probiótica nas fezes e no intestino.

Conclusão

A metodologia indireta proposta não permitiu a estimativa da quantidade de probiótico intestinal a partir de amostras de fezes, durante todo o tempo de suplementação experimental, que implica em novas pesquisas para impedir a eutanásia de animais de criação para tal fim e ao mesmo tempo facilitar o acompanhamento da colonização intestinal. Apesar disso, o probiótico se mostrou eficiente em promover melhora do desempenho zootécnico dos peixes suplementados, e aos 90 dias uma estimativa da concentração poderia ser realizada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6)

Referências

- ASSIS, D. A. S. D.; CAVALCANTE, S. S.; BRITO, M. F. G. D. Avaliação do comércio de peixes ornamentais de água doce em Aracaju, Sergipe. **Magistra**, v. 26, n. 2, p. 213-220, 2014.
- FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; ALVES, L. de O.; DIAS, C. D.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, n. 1, p. 137-144, 2016.
- FURUYA, W. M.; SOUZA S. R.; FURUYA, V. R. B.; HAYASHI C.; RIBEIRO R. P. Dietas peletizada e extrusada para machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de terminação. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 483-487, 1998.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; OVIYA, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 2, p. 660-666, 2013.
- HOLLATZ, T. **Ração suplementada com probiótico na reprodução do peixe Acará-bandeira**. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2015.
- JATOBÁ, A.; MORAES, A.V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochtone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017.

- JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 45-53, 2015.
- KIM, Y. R.; KIM, E. Y.; CHOI, S. Y.; HOSSAIN, M. T.; OH, R.; HEO, W. S.; KONG, I. S. Effect of a probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 526-529, 2012.
- LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n. 2, p. 201-219, 1951.
- MARTEAU, P.; POCHART, P.; DORE, J. L.; BE'RA-MAILLET, C.; BERNALIER, A.; CORTHER, G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4939-4942, 2001.
- MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M. R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of Dietary Probiotic, *Pediococcus acidilactici* and Nucleotide on Reproductive Performance in Goldfish (*Carassius auratus*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. único, p. 1-6, 2018.
- MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T.; BØGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGØ, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1-8, 2010.
- MORAES, A. V. D.; PEREIRA, M. D. O.; MORAES, K. N.; RODRIGUES SOARES, J. P.; JESUS, G. F. A. JATOBÁ, A. Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation system. **Aquaculture Research**, v. único, p. 1-7, 2018.
- MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; PEREIRA, G. V.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hemato immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 276-284, 2017.
- RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G. A.; PANCHENIAK, E. M. G.; SOCCOL, E. F. R. C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v. 264, p. 70-78, 2006.
- RIBEIRO, F. D. A. S.; VASQUEZ, L. A.; FERNANDES, J. B. K.; SAKOMURA, N. K. Feeding level and frequency for freshwater angelfish. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1550-1554, 2012.
- RINGØ, E.; LØVMO, L.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; MAYHEW, T. M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 451-467, 2010.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-71, 2000.
- ZOETENDAL, E. G.; WRIGHT, A. V.; VILPPONEN-SALMELA, T.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3401-3407, 2002.