



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

BRUNA RAFAELA DOS SANTOS SILVA

COMPARAÇÃO ENTRE O MICROBIOMA INTESTINAL DE
PEIXES SADIOS E PEIXES INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

CAMPINAS
2020

BRUNA RAFAELA DOS SANTOS SILVA

**COMPARAÇÃO ENTRE O MICROBIOMA INTESTINAL DE
PEIXES SADIOS E PEIXES INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

Co-Orientador: RENATO PARIZ MALUTA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA BRUNA RAFAELA DOS SANTOS
SILVA E ORIENTADA PELO PROF. DR.
WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA.

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38c Silva, Bruna Rafaela dos Santos, 1996-
Comparação entre o microbioma intestinal de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *Streptococcus agalactiae* / Bruna Rafaela dos Santos Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Coorientador: Renato Pariz Maluta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Streptococcus agalactiae*. 2. Tilápia do Nilo. 3. Microbiota. I. Dias da Silveira, Wanderley, 1956-. II. Maluta, Renato Pariz. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison between the gut microbiome of healthy fish and fish experimentally infected with *Streptococcus agalactiae*

Palavras-chave em inglês:

Streptococcus agalactiae

Nile Tilapia

Microbiota

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Renato Pariz Maluta [Coorientador]

Gerson Nakazato

José Luiz Proença Mórdona

Data de defesa: 07-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1555-7648>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8531167733412232>

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Renato Pariz Maluta

Prof. Dr. José Luiz Proença Modena

Prof. Dr. Gerson Nakazato

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

*Dedico este trabalho aos meus
pais Neuza e José, a minha
irmã Franciele e a minha
sobrinha Ana Vitória.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guardar em cada passo desta caminhada.

Ao meu orientador Wanderley Dias da Silveira e ao meu coorientador Renato Pariz Maluta pela orientação e suporte durante o desenvolvimento desse projeto de mestrado.

Aos colaboradores da empresa PreVet Sanidade aquícola pela disposição, paciência e auxílio nas coletas de amostras.

Aos colaboradores Douglas Antonio Alvaredo Paixão, Emerson Rodrigo Machi Gomes e Gabriela Felix Persinoti, pelo auxílio no preparo das bibliotecas e análise estatística dos resultados obtidos.

Às colegas de laboratório Mariela, Natália, Janaína, Mariana e Dona Neuza, obrigada pela amizade e conversas.

Às amigas Rafaela, Láisa e Karen, obrigada pela torcida e companheirismo, vocês foram um presente em minha vida.

À minha mãe Neuza e ao meu pai José, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por serem uma base tão sólida e forte e por todo apoio e amor incondicional a mim dedicados. Agradeço por me apoiarem e confiarem em mim, muitas vezes, mais que eu mesma. À vocês todo o meu amor.

À minha irmã Franciele, sua garra e dedicação me inspiram, obrigada pela amizade, carinho e companheirismo durante toda a minha vida.

À minha sobrinha Ana Vitória, sua doçura e amor me preenchem, obrigada por dar brilho aos meus dias com seu jeito angelical, a titia te ama infinitamente.

Ao meu namorado Luiz Fernando, seu jeito singular me conforta e me acalma, obrigada pela paciência, apoio e dedicação nestes últimos anos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Prof. Dr. Gerson Nakazato e aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. José Luiz Proença Módena e Prof. Dr. Gerson Nakazato, pelas contribuições.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Biologia, pela excelente estrutura e oportunidades que me foram concedidas, que contribuíram grandemente no meu desenvolvimento em ensino e pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida (2017/22288-7) e pelo auxílio proveniente do Programa Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes (2016/17421-7), que permitiu a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e o mais Ele fará. ”

(Salmos 37:5)

RESUMO

O patógeno *Streptococcus agalactiae* está entre os microorganismos envolvido em doenças em peixes, tanto em pescados de água doce como pescados de água salgada. A septicemia por *S. agalactiae* é uma das principais doenças que afetam o cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Neste trabalho, comparamos o microbioma intestinal de animais saudáveis (n = 27) e animais experimentalmente infectados com *S. agalactiae* (n = 28). Para ambos os grupos, analisaram-se as bactérias aderidas à mucosa (M) e livres nas fezes (F). O microbioma foi estabelecido com 16S rRNA next-generation sequencing (NGS). A média do número de táxons detectados no grupo infectado (M + F) foi menor ($45,87 \pm 30,13$) do que no controle (M + F) ($67,70 \pm 21,10$) ($p < 0,01$). A análise conjunta de mucosa e fezes e a análise isolada apenas de fezes ou apenas de mucosa revelaram OTUs mais associados a amostras de animais infectados quando comparados a animais saudáveis. O número de táxons associados ao grupo infectado variou entre 19 e 61. Quando comparadas as amostras de fezes e mucosas combinadas e somente as amostras fecais o gênero *Streptococcus* estava mais de 4.000 vezes mais abundante no grupo infectado em comparação ao grupo saudável. No entanto, tal gênero esteve apenas cerca de 500 vezes mais abundante nas amostras de mucosa. O táxon *Lactobacillus* spp., também associado ao grupo infectado, apresentou abundâncias semelhantes em todas as categorias de amostras, variando entre 249,2 a 524,37. O gênero *Pleisomonas* apresentou perfil semelhante nas várias categorias de amostras, com abundâncias variando de 9,01 a 12,3 vezes. Os resultados demonstram que a infecção por *S. agalactiae* reduz a variabilidade da microbiota intestinal. Além disso, alguns microrganismos como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Pleisomonas* proliferaram nessa situação.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*; Tilápia do Nilo; Microbiota.

ABSTRACT

The pathogen *Streptococcus agalactiae* is a microorganism associated to fish disease, both in freshwater and seawater. Septicemia due to *S. agalactiae* is one of the major diseases affecting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) husbandry. In this study, we compared the intestinal microbiome of healthy fish (n = 27) and fish experimentally infected with *S. agalactiae* (n = 28). For both groups, bacteria attached to the mucosa (M) and free in feces (F) were analyzed. The microbiome was established with 16S rRNA next-generation sequencing (NGS). The average number of taxa detected in the infected group (M + F) was lower (45.87 ± 30.13) than in the control group (M + F) (67.70 ± 21.10) ($p < 0.01$). Combined analysis of mucosa and feces and isolated analysis of feces only or mucosa only revealed OTUs more associated with samples from infected animals when compared to healthy animals. The number of taxa associated with the infected group ranged from 19 to 61. When comparing the fecal and mucosa samples combined and fecal samples only, the genus *Streptococcus* was more than 4,000 times more abundant in the infected group compared to the healthy group. However, such genus was only about 500 times more abundant in mucosa samples. The taxon *Lactobacillus* spp., also associated with the infected group, had similar abundances in all sample categories, ranging from 249.2 to 524.37. The genus *Pleisomonas* showed a similar profile in the various categories of samples, with abundances ranging from 9.01 to 12.3 times. The results demonstrate that *S. agalactiae* infection reduces the intestinal microbiota variability. Furthermore, some microorganisms as *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Pleisomonas* proliferated in this situation.

Key-words: *Streptococcus agalactiae*; Nile tilapia; Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exofitima	21
Figura 2. Opacificação do olho	21
Figura 3. Coleta de amostra	22
Figura 4. Esquema do desenho experimental	25
Figura 5. Indexação da biblioteca 16S rRNA	36
Figura 6. Curva de rarefação	42
Figura 7. Número de OTUs	44
Figura 8. Índice de Chao1	45
Figura 9. Índice de Shannon	46
Figura 10. Gêneros bacterianos em amostras de fezes	48
Figura 11. Gêneros bacterianos em amostras de mucosa	49
Figura 12. Distribuição de gêneros por grupo amostral	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de DNA.....	26
Tabela 2. Quantificação da biblioteca 16S rRNA.....	31
Tabela 3. Número de reads por amostra.....	37
Tabela 4. Microbiota intestinal de peixes infectados.....	53
Tabela 5. Microbiota das fezes de peixes infectados.....	56
Tabela 6. Microbiota da mucosa de peixes infectados.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°	Graus
°C	Graus Celsius
BAL	bactérias ácido-lácticas
cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
g	Grama
h	Hora
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mA	Miliampère
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
ST	Sequence type
pb	Pares de base
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Inoculação experimental de <i>S. agalactiae</i> e coleta de amostras	20
3.2 Isolamento de DNA	22
3.3 Amplificação e Preparo da Biblioteca 16S rRNA	22
3.4 Normalização e sequenciamento das amostras	24
3.5 Análise dos dados	24
3.6 Etapas de Bioinformática aplicada ao procedimento experimental	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Isolamento de DNA	26
4.2 Sequenciamento 16S rRNA das amostras	36
4.3 Análise de diversidade alfa através do número de OTUs	43
4.4 Descrição de táxons	47
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8. ANEXO	73
8.1 Declaração da Comissão de Ética do Uso de animais	73
8.2 Declaração de direitos autorais	74

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui extensa área territorial e uma vasta rede de bacias hidrográficas. Cerca de 12% da água doce disponível no planeta está em território brasileiro. De acordo com o último anuário divulgado pela Sociedade Brasileira de Psicultura, no ano de 2018 o país produziu 722.560 toneladas de peixes de cultivo, essa produção representa crescimento de 4,5% em relação a produção de 2017, de 691.700 toneladas, crescimento que vem sendo registrado gradualmente desde 2014. Vários fatores influenciam a psicultura no país, como problemas sanitários, mercadológicos, climáticos, bem como fatores econômicos como baixo crescimento do PIB (Produto Interno Bruto) de 1% registrado no ano de 2018 além das altas taxas de desemprego registradas (PEIXE, 2019). As espécies de peixes produzidas no país variam de acordo com as regiões. As espécies tambaqui e pirarucu são predominantemente produzidas na região norte ao passo que na região nordeste há predomínio de tilápia do Nilo e camarão marinho. Nas regiões centro-oeste, sudeste e sul a tilápia está entre as espécies mais cultivadas (RODRIGUES; CAVALCANTI; CAPANEMA; MORCH *et al.*, 2012). O cultivo comercial de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é importante no país e em todo o mundo. O país atualmente ocupa a 4ª posição mundial na produção de tilápias com produção de 400.280 toneladas produzidas no ano de 2018, um crescimento de 11,9% em relação ao ano de 2017 com 357.629 toneladas. Os estados brasileiros que lideram a produção de tilápias são respectivamente, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Bahia (PEIXE, 2019). A tilápia é a principal nessa atividade, por ser resistente a alterações de temperatura da água, infecções, além de ter rápido crescimento e grande demanda como alimento. No entanto, surtos infecciosos provocados por *Streptococcus agalactiae* têm sido responsáveis por perdas econômicas substanciais na aquicultura (WANG; GAN; WANG; YU *et al.*, 2017; WU; GONG; FANG; LIANG *et al.*, 2013).

O patógeno *S. agalactiae* possui morfologia de coco, parede celular Gram positiva, padrão de hemólise *beta* e sorogrupo B de *Lancefield* (GBS). Dentre os hospedeiros de *S. agalactiae* estão humanos, bovinos, camundongos e peixes (ELLIOTT; FACKLAM; RICHTER, 1990). Em peixes, é um dos principais patógenos envolvidos em doenças. Essa bactéria está associada a infecções tanto em pescados

de água doce como pescados de água salgada (ROBINSON, MEYER, 1966; EVANS *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2008).

Além de *S. agalactiae*, a espécie *S. iniae* também causa doenças em peixes (EVANS; KLESIUS; GILBERT; SHOEMAKER *et al.*, 2002). No tocante a produção de tilápias, a septicemia causada por *S. agalactiae* é considerada a enfermidade de maior impacto econômico nas criações comerciais. Ela é caracterizada principalmente por sinais de meningoencefalite. (KLESIUS; SHOEMAKER; EVANS, 2008; PEREIRA; MIAN; OLIVEIRA; BENCHETRIT *et al.*, 2010; SALVADOR; MULLER; FREITAS; LEONHADT *et al.*, 2005).

Surtos provocados por *S. agalactiae* levam a altas taxas de mortalidade, resultando em severos prejuízos econômicos na tilapicultura (ZAMRI-SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010). A mortalidade pode atingir 90%, normalmente na idade de pré-comercialização, quando volumes substanciais de ração já foram consumidos (SALVADOR; MULLER; FREITAS; LEONHADT *et al.*, 2005). Além de seu papel na aquicultura, este patógeno já foi associado a doenças em seres humanos e bovinos, podendo representar um possível risco zoonótico e à saúde animal (PEREIRA; MIAN; OLIVEIRA; BENCHETRIT *et al.*, 2010). Em seres humanos há inclusive um relato mostrando correlação entre o consumo de peixe cru e bacteremia causada por *Streptococcus* do grupo B, pertencentes ao sorotipo III ST 283 (TAN; LIN; FOO; KOH *et al.*, 2016). Assim sendo, medidas no sentido de prevenir a doença causada por esse patógeno são necessárias e devem ser abordadas não só por razões econômicas, mas também pensando em saúde pública (IREGUI; COMAS; VÁSQUEZ; VERJAN, 2016).

Os sinais clínicos observados nas infecções por *S. agalactiae* incluem natação errática, rigidez dorsal, letargia, anorexia, exoftalmia unilateral ou bilateral, opacidade da córnea, hemorragia ocular, hemorragias na base das barbatanas e nadadeiras, além de ulceração da epiderme. Escurecimento da pele, distensão abdominal e deformidades vertebrais também são observados (ALI; HASSAN; SALEHA; SITI *et al.*, 2010; SITI-ZAHRAH; PADILAH; AZILA; RIMATULHANA *et al.*, 2008). Como consequência da infecção, há uma resposta inflamatória crônica sistêmica manifestada através da formação de granulomas observados em diversos órgãos do pescado (ELDAR; BEJERANO; BERCOVIER, 1994; PULIDO; IREGUI; FIGUEROA; KLESIUS, 2016). Estas alterações podem ser detectadas no fígado,

baço, rins, olhos e cérebro. Ademais, congestão brânquial e renal, hepatomegalia acompanhada de congestão, ascite, esplenomegalia, encefalomalácia e congestão cerebral também podem ocorrer (MUSA; WEI; MUSA; HAMDAN *et al.*, 2009; PRETTO-GIORDANO; MÜLLER; FREITAS; SILVA, 2010).

Apesar de já ser do conhecimento da comunidade científica que a infecção não se limita apenas ao trato gastrointestinal, mas também atinge órgãos como fígado, baço, cérebro e olhos (CHANG; PLUMB, 1996; ELDAR; GHITTINO, 1999), a porta de entrada provável da bactéria é o trato gastrintestinal. Um estudo recente que relata a presença de *S. agalactiae* ligada aos microvilos e dentro do citoplasma das células do epitélio intestinal reforça essa possibilidade (IREGUI; COMAS; VÁSQUEZ; VERJAN, 2016).

Os microorganismos da microbiota intestinal produzem metabólitos que exercem efeitos notáveis no ambiente externo e no hospedeiro. Tais efeitos incluem alterações de pH, diminuição da inflamação e desintoxicação. Assim, os microorganismos desempenham papel significativo na fisiologia, metabolismo de nutrientes e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (BERDY, 2005; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014). Em peixes, as bactérias são os principais componentes da microbiota intestinal. Muitos estudos, na tentativa de aumentar desempenho de crescimento e diminuir perdas econômicas na aquicultura, têm relacionado a integridade da microbiota com o bem estar e saúde do pescado.

Nesse contexto, em tilápias, o papel da microbiota intestinal tem sido explorado para fins de neutralização da toxicidade por metais contaminantes na água (YU; QIAO; LI; YU *et al.*, 2019). Além disso, muitos probióticos vêm sendo utilizados como suplemento alimentar pois servem como método alternativo no controle e combate a doenças infecciosas (PIRARAT; PINPIMAI; RODKHUM; CHANSUE *et al.*, 2015). O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* parece ser eficaz no controle de infecções por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* e *Flavobacterium psychrophilum* em truta arco-íris (NIKOSKELAINEN; OUWEHAND; SALMINEN; BYLUND, 2001) e *Edwardsiella tarda* em tilápia (PIRARAT; KOBAYASHI; KATAGIRI; MAITA *et al.*, 2006).

Foram alcançados significativos avanços na microbiologia devido a inserção de técnicas de biologia molecular. Essas técnicas permitem a identificação de microorganismos substituindo a caracterização convencional que é feita por

morfologia, características de coloração e identificação bioquímica. A identificação molecular de procariotos ocorre pela caracterização de regiões hipervariáveis da região 16S do RNA ribossômico. Essas regiões são flanqueadas por regiões constantes do material genético. Dessa forma, é possível desenhar *primers* que iniciem a amplificação por essas regiões constantes. A amplificação dessas regiões de interesse através da *polymerase chain reaction* (PCR), desenvolvida em 1985, serve de base para a maioria das reações moleculares de identificação, inclusive sequenciamento.

O processo de sequenciamento da região 16S rRNA gera centenas de sequências curtas do genoma. Essas sequências são classificadas em Unidade Taxonomias Operacionais (OTUs) e através de *pipelines* de bioinformática podem ser alinhadas, organizadas e classificadas de acordo com informações existentes em bancos de dados.

O sequenciamento de DNA durante muitos anos foi baseado na bioquímica de Sanger, também conhecido como eletroforese capilar ou sequenciamento dideoxi. O princípio do sequenciamento Sanger consiste na adição pela polimerase de dideoxinucleotídeos, ou seja, nucleotídeos que não possuem o terminal hidroxila livre na extremidade 3' da pentose (ddNTPs). Com a ausência do grupo OH o próximo nucleotídeo não consegue se ligar e a replicação é interrompida. Dessa maneira, são obtidas milhares de fitas do mesmo fragmento de DNA em diferentes tamanhos. O intuito final é reconstruir a sequência de interesse com um nucleotídeo por vez. Isso é possível pois, ao final da amplificação com os dideoxinucleotídeos, os fragmentos são submetidos a uma eletroforese capilar em gel com propriedade semelhante a eletroforese convencional, ou seja, os fragmentos são ordenados de acordo com diferença de tamanho. À medida que a amostra contendo os fragmentos de DNA amplificados com ddNTPs correm através do capilar preenchido por um polímero e são excitados por um laser, o nucleotídeo marcado com fluorocromo emite um comprimento de onda correspondente a cor marcada. Ao final, tem-se a tradução do sequenciador dos comprimentos de onda emitidos por cada uma das bases nitrogenadas marcadas com cores diferentes. O resultado é expresso em picos de diferentes cores que correspondem a cor de cada nucleotídeo marcado representado a sequência completa do fragmento sequenciado.

A partir de 2005, a criação do analisador de genoma GenomeAnalyser, com técnicas de sequenciamento massivo gerou um salto de 84 kilobases (kb) para 1 gigabase (Gb) por corrida, revolucionando a saída de dados do sequenciamento, conhecida a partir de então como Next Generation Sequencing (NGS) (COLLINS; MORGAN; PATRINOS, 2003). Desse modo, a diferença crítica entre o sequenciamento de Sanger e NGS é o volume do sequenciamento. O método de Sanger sequencia apenas um único fragmento de DNA de cada vez, enquanto tecnologias de NGS permitem um sequenciamento paralelo de milhões de fragmentos simultaneamente. O sequenciamento Illumina, com maior destaque no mercado atual, sequencia fragmentos de DNA de interesse com base na adição pela polimerase de ddNTPs, que é o mesmo princípio do sequenciamento Sanger. Os fragmentos a serem sequenciados nesta plataforma são acrescidos de sequências de DNA específicas (index 1 e index 2) em cada extremidade das cópias de DNA a serem sequenciadas. Dessa forma, após a reação de sequenciamento, é possível identificar cada sequência amplificada. Com os fragmentos de DNA indexados, as amostras são sequenciadas em uma lâmina de vidro (*flow cell*). Nela ocorre um processo de amplificação dos fragmentos para a formação de *clusters*. Com os *clusters* formados, o sequenciador é capaz de detectar os fótons de luz emitidos após a incorporação dos ddNTPs na reação de sequenciamento. A identificação das sequências ocorre pela cor correspondente a cada nucleotídeo.

Assim, considerando a importância de infecções bacterianas nas pisciculturas, e a qualidade de dados gerados por sequenciamento, é interessante realizar um trabalho descrevendo a interação de um dos principais patógenos com os elementos da microbiota intestinal de peixes. Dessa forma, procuramos identificar as alterações da população bacteriana no intestino de peixes infectados bem como a proliferação de determinados táxons decorrente da infecção. Com isso, a descrição da microbiota de peixes infectados, comparada com a microbiota de peixes saudáveis, pode fornecer subsídios para medidas de controle contra esta importante doença da piscicultura.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo comparar a microbiota bacteriana intestinal de peixes saudáveis e peixes experimentalmente infectados com *S. agalactiae* através de sequenciamento de nova geração da região hipervariável do gene 16S rRNA.

2.2 Específicos

I. Determinar a microbiota bacteriana intestinal aderida à mucosa de peixes saudáveis.

II. Determinar a microbiota bacteriana intestinal presente nas fezes de peixes saudáveis.

III. Determinar a microbiota bacteriana intestinal aderida à mucosa de peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

IV. Determinar a microbiota bacteriana intestinal presente nas fezes de peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

V. Comparar a microbiota intestinal aderida à mucosa e presente nas fezes de peixes saudáveis versus peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Inoculação experimental de *S. agalactiae* e coleta de amostras

Cem tilápias juvenis, 20 gramas cada, foram igualmente distribuídas em 4 tanques (25 tilápias em cada tanque) e mantidas por um período de 15 dias de adaptação em água com temperatura de 31°C e com quantidade de alimentação oferecida de aproximadamente 3% do peso vivo dos animais.

Após o período de adaptação, foi iniciado o experimento, onde os peixes foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo 1 (G1: Controle, n=50): Tilápias inoculadas (inoculação oral) com 100 µl de solução salina. Grupo 2 (G2, n=50): Tilápias inoculadas (inoculação oral) com 100 µl de solução bacteriana contendo $1,98 \times 10^2$ UFC de *S. agalactiae* cepa 21171A.

Ao apresentarem sinais neurológicos graves, indicativos de morte iminente, 28 animais doentes foram eutanasiados através da aplicação de eugenol na água. Ao final do experimento, 27 animais saudáveis também foram eutanasiados da mesma forma. Um segmento de 1 g de intestino de cada peixe (**Figura 3**) foi retirado assepticamente, lavado intensamente e homogeneizado em 9 mL de PBS. Este segmento foi utilizado para análise da microbiota das mucosas intestinais. Além disso, 0,1 g de conteúdo intestinal de cada peixe foi homogeneizado em 0,9 mL de PBS. Este conteúdo foi usado para a determinação da microbiota das fezes.

Além dos sinais clínicos (**Figura 1 e 2**), para confirmação da infecção, foram realizadas culturas em ágar sangue do cérebro dos animais infectados. A infecção foi confirmada através das características das colônias (puntiformes), padrão de hemólise e presença de cocos gram positivos através da coloração de Gram.



Figura 1. Exoftalmia. Sinal clínico de infecção por *S. agalactiae* em tilápias no momento da coleta de amostras do grupo infectado.



Figura 2. Opacificação do olho. Sinal clínico de infecção por *S. agalactiae* em tilápias no momento da coleta de amostras do grupo infectado.



Figura 3. Coleta de amostras. Tamanho médio do segmento intestinal coletado (seta) de cada peixe para determinação das bactérias aderidas a mucosa.

3.2 Isolamento de DNA

As amostras coletadas foram processadas com ZymoBiomics DNA Miniprep Kit (Zymo, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para amostras de mucosa, antes de se iniciar o protocolo, as amostras foram previamente incubadas à 55°C por 2 horas em 10 µl de proteinase K, 95 µl de água Tipo 1 autoclavada e 95 µl de “Solid Tissue Buffer Blue”, para maior eficiência na obtenção do DNA. Controle microbiano padrão (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard, Zymo Research, EUA) foi utilizado para validação do processo de extração de ácidos nucleicos e sequenciamento. Ao final foram obtidos 50 µl de DNA extraído de cada amostra e do controle microbiano padrão. As alíquotas de DNA foram posteriormente quantificadas através de método fluorimétrico (Qubit dsDNA HS, Thermo, EUA) e armazenadas a -20°C para posterior preparo da biblioteca 16S rRNA e sequenciamento.

3.3 Amplificação e Preparo da Biblioteca 16S rRNA

Com o DNA obtido das amostras de peixes saudáveis e peixes infectados, foi realizada a amplificação das regiões V3 e V4 do 16S rRNA com os primers de acordo com o protocolo da Illumina (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf):

16S-F	(5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCA)G
16S-R	(5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC C).

A reação de amplificação foi realizada com 4 µl de HF Buffer; 0,4 µl (10mM) de dNTP; 1 µl de cada primer 16S-F e 16S-R; 0,6 µl de DMSO; 0,5 µl (1.5 U) de Phusion polimerase e um volume de 7,5 µl (input de 10 ng) de DNA, totalizando uma reação de 15 µl de volume final.

A amplificação da região V3 e V4 foi realizada em termociclador (Applied Biosystem) programado com o regime de ciclo seguindo as seguintes condições: 3 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e, em seguida, 5 minutos a 72°C. Controle negativo (água miliq autoclavada) e positivo (DNA extraído da cultura comercial - ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard) foram incluídos no ciclo de cada reação de PCR. Após amplificação os fragmentos amplificados foram observados em gel de agarose (1,5%) e técnica de eletroforese, a 80 V por 60 minutos.

Após amplificação, os fragmentos de 16S amplificados foram purificados utilizando esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) na proporção Bead/DNA 1:1 e então o DNA foi ressuspendido em 25µl de água ultrapura estéril.

Todos os amplicons 16S purificados foram duplamente indexados com o Nextera Index Kit (Illumina), Index 1 (N7XX) e Index 2 (S5XX) e novamente purificados de acordo com protocolo.

A reação de indexação foi realizada com 10 µl de HF Buffer; 1 µl (10mM) de dNTP; 5 µl de cada Index (N7XX e S5XX); 1,5 µl de DMSO; 0,5 µl (1,5 U) de Phusion polimerase; 10 µl de água ultrapura estéril e um volume de 2 µl (input de 10 ng) de DNA, totalizando uma reação de 25 µl de volume final e o regime de ciclo aplicado foram: 3 minutos a 95°C, seguido de 12 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e, em seguida, 5 minutos a 72°C. Controle negativo (água miliq autoclavada) e positivo (DNA extraído da cultura comercial - ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard) foram incluídos no ciclo de cada reação de PCR. Após indexação os fragmentos amplificados foram purificados de acordo com protocolo e observados em gel de agarose (1,5%) e técnica de eletroforese, a 80 V por 60 minutos.

3.4 Normalização e sequenciamento das amostras

As etapas de normalização e sequenciamento das amostras foram realizadas no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM), com auxílio do biólogo Douglas Antonio Alvaredo Paixão e do analista de desenvolvimento tecnológico Emerson Rodrigo Machi Gomes.

As bibliotecas foram normalizadas a 10 nM, diluídas em TRIS-HCl pH 8.0 a 10nM e posteriormente diluídas a 10 pM para que suas concentrações atingissem os pontos da curva que compõe o Kit KAPA de quantificação em tempo real (RT-PCR). O pool de amostras foi preparado a 2,5 nM para então serem sequenciadas na plataforma MiSeq Illumina com o MiSeq Reagent Kit v3 (2x 300). Após as corridas, os reads foram demultiplexados no ambiente BaseSpace da Illumina.

3.5 Análise dos dados

As análises de bioinformática foram realizadas em parceria com a especialista de bioinformática Gabriela Felix Persinoti, do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR/CNPEM).

Os reads foram demultiplexados e em seguida filtrados para retirada dos adaptadores (indexes e primers) e remoção de bases com baixa qualidade com Trimmomatic 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014).

O controle de qualidade consistiu na retirada dos adaptadores e remoção de bases com baixa qualidade, dessa forma, os reads que apresentaram qualidade adequada foram combinados (“merged”) e clusterizados em Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) utilizando a função *unoise* do software USEARCH v11 (EDGAR, 2010).

A determinação taxonômica das amostras foi realizada utilizando o banco de dados RDP database formatado para a função *utax* também do software USEARCH (COLE; WANG; FISH; CHAI *et al.*, 2013; EDGAR, 2010). Por fim, as análises estatísticas foram feitas em R usando o pacote *phyloseq* 1.22.3 (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e *vegan* (DIXON, 2003). O teste *t* unpaired foi feito com o programa Prism (disponível em <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para detectar se havia diferença significativa na Riqueza (índice de Chao1) e Diversidade (índice de Shannon) entre as

comunidades bacterianas dos dois grupos analisados, considerando-se o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3.6 Etapas de Bioinformáticas aplicada ao procedimento experimental

As etapas de bioinformática realizadas no presente trabalho são apresentadas na **Figura 4**.

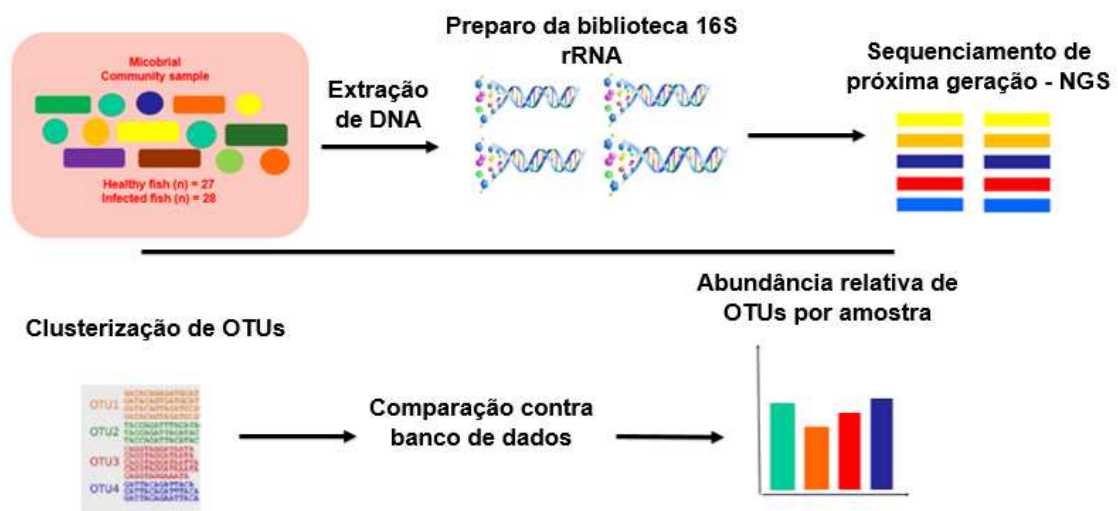


Figura 4. Esquema do desenho experimental. Visão geral dos procedimentos de bioinformática adotados para obtenção e caracterização dos táxons bacterianos presentes na microbiota intestinal de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*. Figura adaptada de: MORGAN; HUTTENHOWER, 2012 < <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808> >

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de DNA

Vinte e oito amostras de animais infectados e 27 amostras de animais controle foram analisadas. Todas as culturas em ágar sangue do encéfalo dos animais infectados no momento da eutanásia apresentaram crescimento de colônias típicas do gênero *Streptococcus* spp e presença de cocos Gram-positivos em pares ou cadeias.

A quantificação do DNA das amostras coletadas (fezes e segmento intestinal) do grupo saudável e doente estão detalhadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Quantificação de DNA. Quantificação do DNA isolado com ZymoBiomix DNA Miniprep Kit (Zymo, EUA) pelo método fluorimétrico.

Identificação	Origem	Grupo experimental	Concentração (ng/ μL)
200F	Fezes	Infectado	42,0
201F	Fezes	Infectado	42,2
202F	Fezes	Infectado	96,4
203F	Fezes	Infectado	21,4
204F	Fezes	Infectado	22,4
205F	Fezes	Infectado	70,0
206F	Fezes	Infectado	57,6
208F	Fezes	Infectado	50,0
209F	Fezes	Infectado	acima do limiar
210F	Fezes	Infectado	118
211F	Fezes	Infectado	acima do limiar
212F	Fezes	Infectado	96,8

214F	Fezes	Infectado	92,4
215F	Fezes	Infectado	18,3
216F	Fezes	Infectado	94,6
217F	Fezes	Infectado	89,4
218F	Fezes	Infectado	104,0
219F	Fezes	Infectado	104,0
220F	Fezes	Infectado	104,0
221F	Fezes	Infectado	33,0
222F	Fezes	Infectado	acima do limiar
223F	Fezes	Infectado	26,4
224F	Fezes	Infectado	79,4
225F	Fezes	Infectado	90,8
226F	Fezes	Infectado	14,1
227F	Fezes	Infectado	95,8
228F	Fezes	Infectado	91,6
229F	Fezes	Infectado	acima do limiar
200M	Mucosa	Infectado	100,0
201M	Mucosa	Infectado	96,4
202M	Mucosa	Infectado	31,2
203M	Mucosa	Infectado	57,8
204M	Mucosa	Infectado	acima do limiar
205M	Mucosa	Infectado	49,0
206M	Mucosa	Infectado	acima do limiar
208M	Mucosa	Infectado	20,02
209M	Mucosa	Infectado	acima do limiar

210M	Mucosa	Infectado	120,0
211M	Mucosa	Infectado	acima do limiar
212M	Mucosa	Infectado	364,2
214M	Mucosa	Infectado	408,4
215M	Mucosa	Infectado	436,3
216M	Mucosa	Infectado	398,0
217M	Mucosa	Infectado	55,8
218M	Mucosa	Infectado	332,1
219M	Mucosa	Infectado	173,6
220M	Mucosa	Infectado	396,3
221M	Mucosa	Infectado	196,8
222M	Mucosa	Infectado	282,0
223M	Mucosa	Infectado	358,1
224M	Mucosa	Infectado	309,0
225M	Mucosa	Infectado	304,8
226M	Mucosa	Infectado	464,3
227M	Mucosa	Infectado	317,4
228M	Mucosa	Infectado	380,1
229M	Mucosa	Infectado	206,1
230F	Fezes	Saudável	239,6
231F	Fezes	Saudável	195,0
232F	Fezes	Saudável	213,8
233F	Fezes	Saudável	16,25
234F	Fezes	Saudável	272,9
235F	Fezes	Saudável	10,4

236F	Fezes	Saudável	155,3
237F	Fezes	Saudável	10,9
238F	Fezes	Saudável	140,2
239F	Fezes	Saudável	10,9
240F	Fezes	Saudável	10,6
241F	Fezes	Saudável	312,4
242F	Fezes	Saudável	302,2
243F	Fezes	Saudável	280,6
244F	Fezes	Saudável	291,6
245F	Fezes	Saudável	165,0
246F	Fezes	Saudável	290,8
247F	Fezes	Saudável	193,5
248F	Fezes	Saudável	251,4
249F	Fezes	Saudável	28,4
250F	Fezes	Saudável	73,9
251F	Fezes	Saudável	203,9
252F	Fezes	Saudável	244,2
253F	Fezes	Saudável	89,6
254F	Fezes	Saudável	24,2
255F	Fezes	Saudável	20,5
256F	Fezes	Saudável	10,6
230M	Mucosa	Saudável	250,2
231M	Mucosa	Saudável	252,8
232M	Mucosa	Saudável	10,0
233M	Mucosa	Saudável	180,0

234M	Mucosa	Saudável	295,4
235M	Mucosa	Saudável	434,3
236M	Mucosa	Saudável	186,9
237M	Mucosa	Saudável	200,6
238M	Mucosa	Saudável	420,2
239M	Mucosa	Saudável	10,2
240M	Mucosa	Saudável	10,9
241M	Mucosa	Saudável	421,0
242M	Mucosa	Saudável	10,7
243M	Mucosa	Saudável	288,0
244M	Mucosa	Saudável	425,5
245M	Mucosa	Saudável	429,0
246M	Mucosa	Saudável	10,7
247M	Mucosa	Saudável	20,0
248M	Mucosa	Saudável	10,2
249M	Mucosa	Saudável	100,2
250M	Mucosa	Saudável	212,3
251M	Mucosa	Saudável	338,2
252M	Mucosa	Saudável	10,6
253M	Mucosa	Saudável	28,6
254M	Mucosa	Saudável	10,0
255M	Mucosa	Saudável	512,8
256M	Mucosa	Saudável	10,9

Foram amplificadas as regiões V3 e V4 do 16S rRNA de todas amostras que tiveram DNA extraído. Ao final do preparo da biblioteca 16S rRNA e indexação, dez amostras (202F, 225F, 229F, 201M, 225M, 226F, 226M, 227M, 228M e 229M) de peixes infectados e seis amostras (234M, 238M, 252F, 254M, 255M e 256M) de peixes saudáveis foram excluídas das etapas subsequentes do projeto por não apresentarem quantificação mínima de DNA esperada (10ng/uL) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Quantificação da biblioteca 16S rRNA. Quantificação de DNA dos amplicons purificados e indexados da biblioteca 16S rRNA

Identificação	Origem	Grupo experimental	Concentração (ng/ μL)
200F	Fezes	Infectado	19,2
201F	Fezes	Infectado	31,2
202F	Fezes	Infectado	3,6
203F	Fezes	Infectado	20,5
204F	Fezes	Infectado	54,2
205F	Fezes	Infectado	43,6
206F	Fezes	Infectado	44,6
208F	Fezes	Infectado	21,4
209F	Fezes	Infectado	25,6
210F	Fezes	Infectado	39,6
211F	Fezes	Infectado	52,0
212F	Fezes	Infectado	41,8
214F	Fezes	Infectado	41,2
215F	Fezes	Infectado	35,6
216F	Fezes	Infectado	36,8

217F	Fezes	Infectado	32,4
218F	Fezes	Infectado	31,0
219F	Fezes	Infectado	40,6
220F	Fezes	Infectado	38,0
221F	Fezes	Infectado	40,8
222F	Fezes	Infectado	32,2
223F	Fezes	Infectado	20,1
224F	Fezes	Infectado	30,6
225F	Fezes	Infectado	2,7
226F	Fezes	Infectado	2,8
227F	Fezes	Infectado	35,0
228F	Fezes	Infectado	26,2
229F	Fezes	Infectado	0,1
200M	Mucosa	Infectado	24,8
201M	Mucosa	Infectado	2,88
202M	Mucosa	Infectado	20,4
203M	Mucosa	Infectado	6,3
204M	Mucosa	Infectado	51,8
205M	Mucosa	Infectado	42,6
206M	Mucosa	Infectado	37,6
208M	Mucosa	Infectado	41,6
209M	Mucosa	Infectado	8,26
210M	Mucosa	Infectado	29,4
211M	Mucosa	Infectado	33,6
212M	Mucosa	Infectado	14,9

214M	Mucosa	Infectado	26,8
215M	Mucosa	Infectado	18,2
216M	Mucosa	Infectado	26,8
217M	Mucosa	Infectado	13,5
218M	Mucosa	Infectado	39,6
219M	Mucosa	Infectado	39,2
220M	Mucosa	Infectado	28,4
221M	Mucosa	Infectado	29,6
222M	Mucosa	Infectado	36,2
223M	Mucosa	Infectado	28,4
224M	Mucosa	Infectado	10,9
225M	Mucosa	Infectado	6,52
226M	Mucosa	Infectado	2,5
227M	Mucosa	Infectado	1,52
228M	Mucosa	Infectado	7,08
229M	Mucosa	Infectado	4,6
230F	Fezes	Saudável	31,8
231F	Fezes	Saudável	27,2
232F	Fezes	Saudável	5,18
233F	Fezes	Saudável	34,6
234F	Fezes	Saudável	9,36
235F	Fezes	Saudável	20,6
236F	Fezes	Saudável	14,8
237F	Fezes	Saudável	19,1
238F	Fezes	Saudável	22,4

239F	Fezes	Saudável	25,4
240F	Fezes	Saudável	20,2
241F	Fezes	Saudável	17,6
242F	Fezes	Saudável	14,6
243F	Fezes	Saudável	18,8
244F	Fezes	Saudável	15,2
245F	Fezes	Saudável	21,6
246F	Fezes	Saudável	20,4
247F	Fezes	Saudável	25,8
248F	Fezes	Saudável	21,8
249F	Fezes	Saudável	36,0
250F	Fezes	Saudável	1,31
251F	Fezes	Saudável	52,0
252F	Fezes	Saudável	1,4
253F	Fezes	Saudável	52,0
254F	Fezes	Saudável	14,9
255F	Fezes	Saudável	29,4
256F	Fezes	Saudável	22,6
230M	Mucosa	Saudável	23,4
231M	Mucosa	Saudável	26,8
232M	Mucosa	Saudável	29,4
233M	Mucosa	Saudável	26,0
234M	Mucosa	Saudável	5,2
235M	Mucosa	Saudável	20,6
236M	Mucosa	Saudável	30,0

237M	Mucosa	Saudável	35,4
238M	Mucosa	Saudável	4,8
239M	Mucosa	Saudável	45,8
240M	Mucosa	Saudável	28,4
241M	Mucosa	Saudável	22,6
242M	Mucosa	Saudável	41,0
243M	Mucosa	Saudável	38,8
244M	Mucosa	Saudável	33,8
245M	Mucosa	Saudável	33,0
246M	Mucosa	Saudável	35,0
247M	Mucosa	Saudável	24,6
248M	Mucosa	Saudável	42,0
249M	Mucosa	Saudável	1,2
250M	Mucosa	Saudável	42,0
251M	Mucosa	Saudável	13,7
252M	Mucosa	Saudável	4,0
253M	Mucosa	Saudável	20,2
254M	Mucosa	Saudável	0,4
255M	Mucosa	Saudável	0,3
256M	Mucosa	Saudável	0,4

Ao final, um gel de agarose 1,5% foi realizado com algumas amostras indexadas e não indexadas, paralelamente, para certificação de que a indexação foi eficiente (**Figura 1**). Conforme esperado, as amostras indexadas apresentaram amplicons maiores do que os das amostras não indexadas.

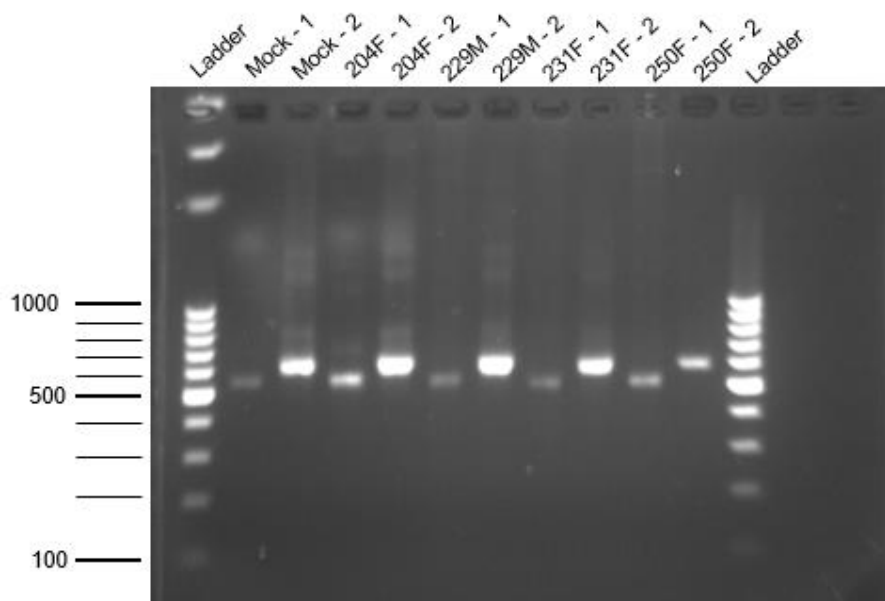


Figura 5. Indexação da biblioteca 16S rRNA. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) para verificação da etapa de indexação (amostras Mock 2; 204F - 2; 229M - 2; 231F - 2 e 250 - 2), em comparação com a etapa de amplificação da região 16S rRNA pré-indexação (amostras Mock 1; 204F - 1; 229M - 1; 231F - 1 e 250 - 1). Ladder (marcador molecular) de 100 pb.

4.2 Sequenciamento 16S rRNA das amostras

Todas as bibliotecas foram normalizadas através do Kit KAPA de quantificação em tempo real e sequenciadas na plataforma MiSeq Illumina com MiSeq Reagent Kit v3 (2x 300).

Ao final da etapa de sequenciamento, uma amostra de mucosa de peixe infectado (224M) e uma amostra controle (237M) não geraram dados adequados na corrida, portanto foram retiradas da análise. No total, foram obtidas com sucesso após o sequenciamento 23 amostras de fezes e 22 amostras de mucosa de animais experimentalmente infectados e 26 amostras de fezes e 21 amostras de mucosa de animais saudáveis, totalizando 92 amostras sequenciadas com sucesso (**Tabela 3**).

Ao final do sequenciamento, foram obtidos no total 2.875.457 *reads*. Após o controle de qualidade e etapa de *merging*, foram computados 757.032 *reads* dentre os dois grupos analisados. No grupo controle, o número de *reads* após o *merging* e controle de qualidade variou entre 2929 e 22935, com média 8766,22 (**Tabela 3**). Já no grupo infectado, o *reads merged* variaram entre 1687 e 20819, com média 7596,96.

A variação do valor mínimo e máximo de reads encontrados em ambos os grupos experimentais refletiram a quantidade de OTUs associadas as amostras. Dessa forma, ao se observar a curva de rarefação (**Figura 2**), nota-se que somente três amostras (X205F_S17; X250M_S67; X202M_S8) e os controles positivos *in silico* (X7keffir.16s_S101; X5keffir.16s_S14; X4keffir.16s_S13; X2keffir.16S_S2) atingiram a curva de saturação (curva paralela ao eixo x). Assim, tem-se que a diversidade microbiana da maior parte das amostras não foi totalmente acessada. Entretanto, os organismos mais abundantes foram provavelmente identificados.

Tabela 3. Número de reads por amostra. Dados quantitativos do sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina com o MiSeq Reagent Kit v3 (2x 300).

Identificação	Número de reads ao final do sequenciamento	Número de reads após trimagem e <i>merging</i> .
200F	19459	5444
201F	38279	7863
203F	16622	2133
204F	16734	3700
205F	69268	20819
206F	21246	5159
208F	38933	12968
209F	47798	12791
210F	32326	6626
211F	57693	11400
212F	15832	4584
214F	30403	6212
215F	67184	16907
216F	34111	5961

217F	28587	7074
218F	28859	7979
219F	22248	4233
220F	17183	4595
221F	20736	5744
222F	48150	12629
223F	11713	2734
224F	22091	4384
227F	25612	5347
228F	37889	9298
200M	14706	3969
202M	39060	6516
203M	23474	1687
204M	21792	5243
205M	19730	4731
206M	70382	16395
208M	29943	7121
209M	61778	15850
210M	31457	7419
211M	39290	9257
212M	15579	4309
214M	20292	4651
215M	21921	7221
216M	31260	7071
217M	24600	6008

218M	44101	7592
219M	20841	5690
220M	52415	17035
221M	15691	4748
222M	24453	6471
223M	24765	6295
230F	39770	11482
231F	25897	7669
232F	25792	7449
233F	59094	17050
234F	11449	2967
235F	30099	9686
236F	13427	4427
237F	24786	8208
238F	23513	6496
239F	25028	7250
240F	42308	11581
241F	40625	11647
242F	67321	16312
243F	33119	9958
244F	34987	10078
245F	27391	8169
246F	44479	12899
247F	13051	4152
248F	72156	22935

249F	13289	4262
250F	20863	6607
251F	24272	7312
253F	34995	10606
254F	16782	5144
255F	31035	10108
256F	27281	7981
230M	39944	11368
231M	31981	9053
232M	29915	8208
233M	29551	8479
235M	29721	7923
236M	26089	6095
239M	11290	3395
240M	20865	2929
241M	33026	7742
242M	30725	7714
243M	19244	5235
244M	32840	9120
245M	17659	4688
246M	18894	5062
247M	41990	10725
248M	20074	5501
249M	51195	14333
250M	51982	18230

251M	35123	7718
252M	31937	8881
253M	32117	10335

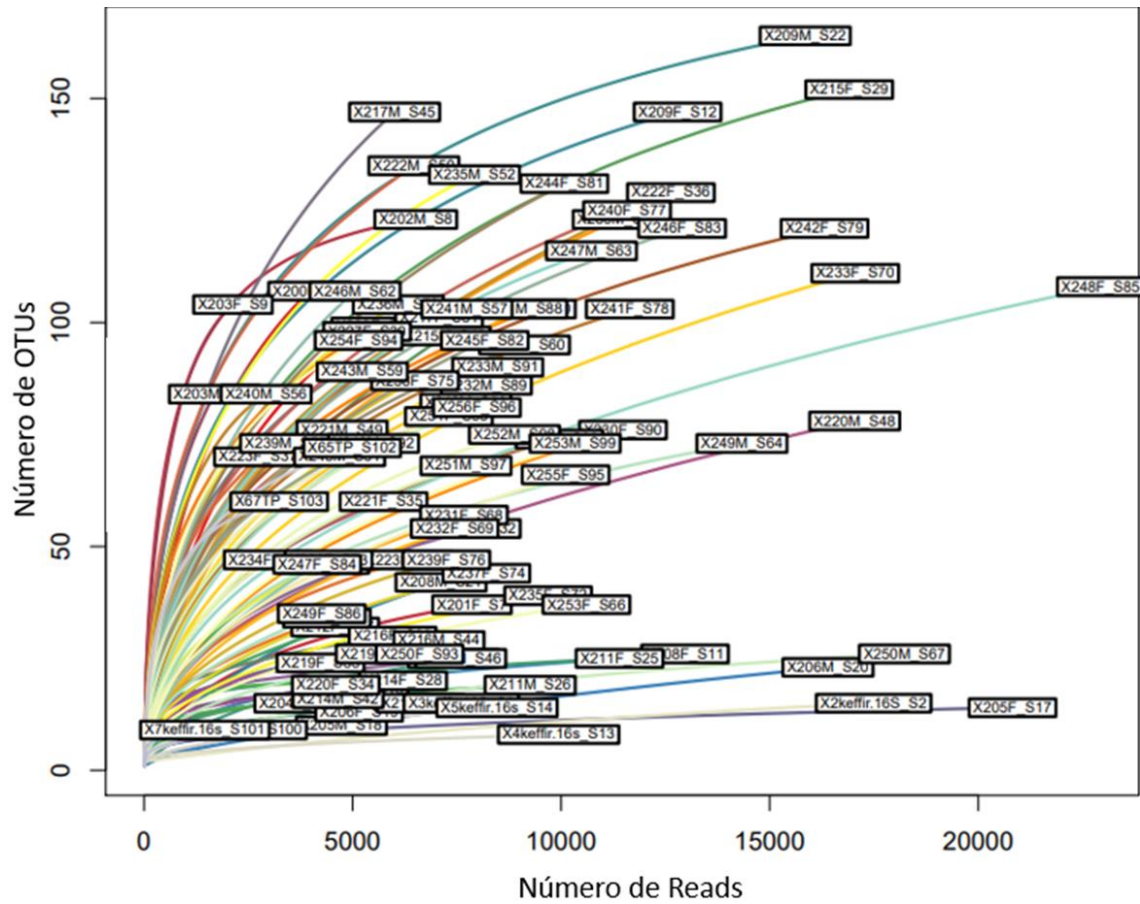


Figura 6. Curva de rarefação. Curva de rarefação das amostras de fazes e mucosa de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*. Amostras de kefir (X7kefir.16s_S101; X5kefir.16s_S14; X4kefir.16s_S13; X2kefir.16S_S2) foram utilizadas como controle positivo *in silico* durante a confecção da curva de rarefação.

4.3 Análise de diversidade alfa através do número de OTUs

A análise da riqueza de táxons encontrado por amostra reflete a diversidade alfa. Esta diversidade foi calculada em número de OTUs observados (**Figura 3**), Índice de Chao1 (**Figura 4**) e Índice de Shannon (**Figura 5**).

Em relação ao número de OTUs observados, o número de táxons detectados no grupo infectado foi menor quando comparado ao grupo controle tanto ao analisar as bactérias aderidas à mucosa, livres nas fezes ou todo o microbioma (mucosa + fezes).

A diversidade alfa da microbiota (Mucosa e Fezes) encontrada através do índice de Chao1 (**Figura 4**) apresentou resultados semelhantes à análise de OTUS observados, na qual foi notada menor diversidade no grupo desafiado em relação ao grupo controle. Entretanto, a diversidade demonstrada pelo Índice de Shannon não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais (**Figura 5**).

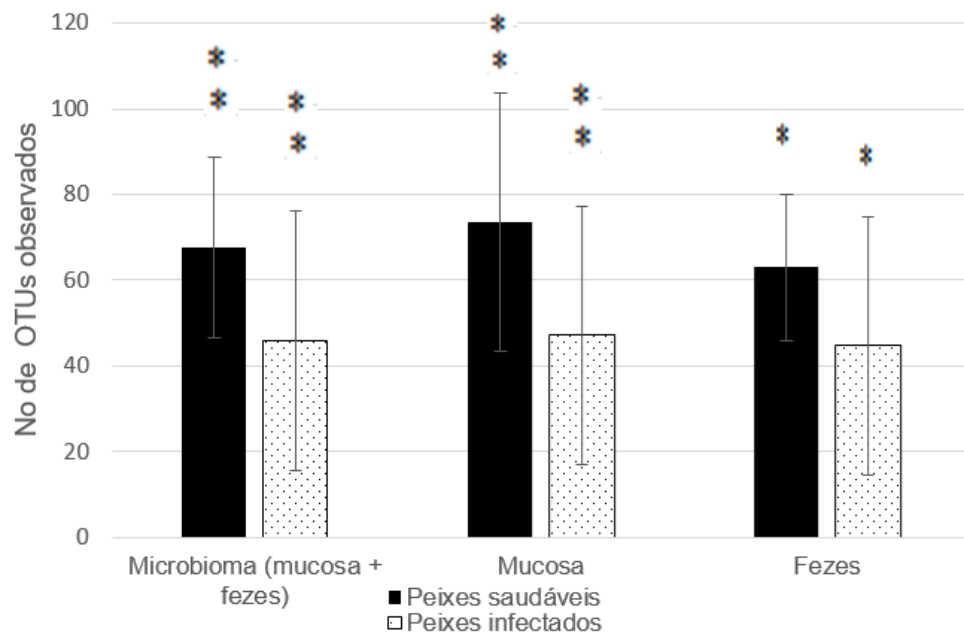


Figura 7. Número de OTUs. Distribuição do número de OTUs (média $\pm$ desvio padrão) observados por amostra de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (teste *t* unpaired). Peixes saudáveis: $67,7 \pm 21,0$. Peixes saudáveis amostras de mucosa $73,4 \pm 17,0$. Peixes saudáveis amostras de fezes $63,0 \pm 23,1$. Peixes infectados: $45,8 \pm 30,1$. Peixes infectados amostras de mucosa $47,0 \pm 31,6$. Peixes infectados amostras de fezes $23,1 \pm 29,4$.

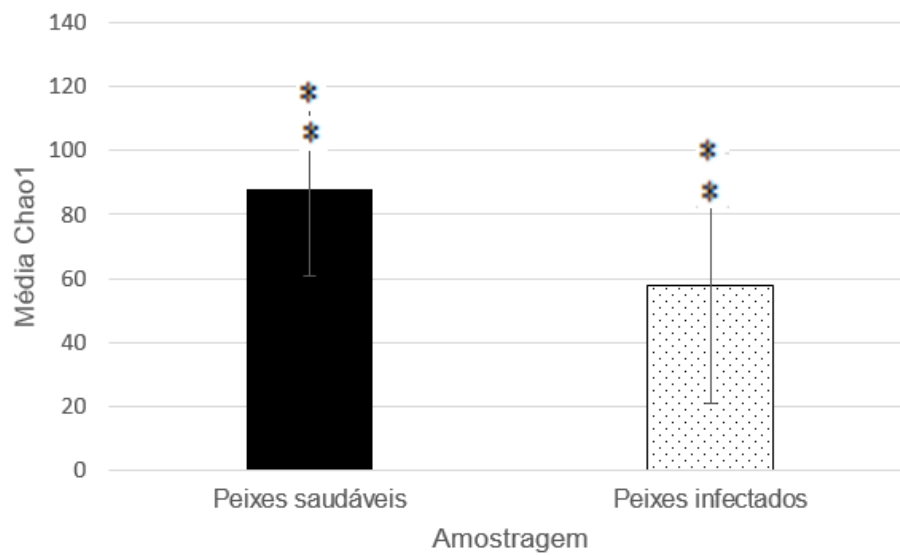


Figura 8. Índice de Chao1. Diversidade média $\pm$ desvio padrão de espécies com índice de Chao1 em amostras (Mucosa e Fezes) do grupo infectado e grupo controle. ** $p < 0,01$ (teste t unpaired). Peixes saudáveis: $87,9 \pm 27,0$. Peixes infectados: $57,9 \pm 36,7$.

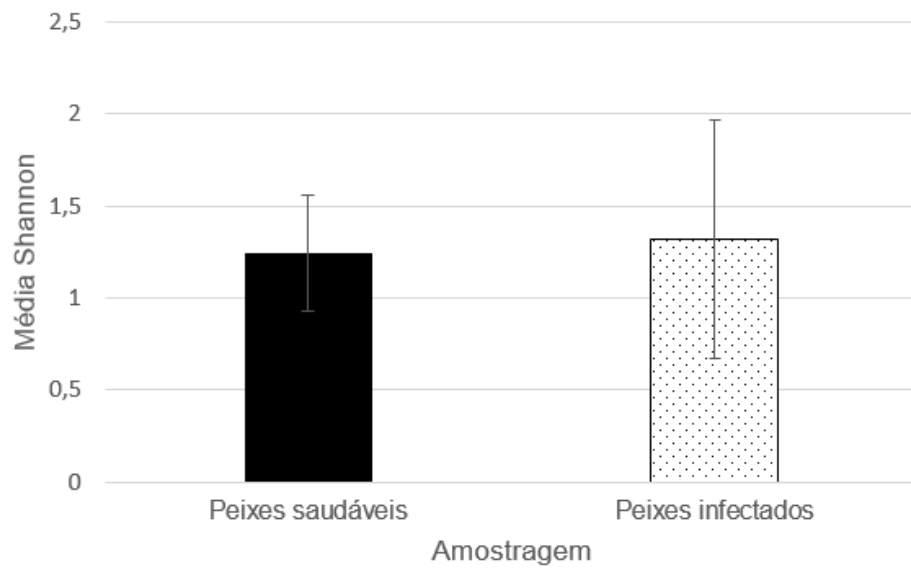


Figura 9. Índice de Shannon. Diversidade média $\pm$ desvio padrão de espécies com índice de Shannon em amostras (Mucosa e Fezes) do grupo infectado e grupo controle. Peixes saudáveis: $1,2 \pm 0,3$. Peixes infectados: $1,31 \pm 0,6$.

4.4 Descrição de táxons

Quando analisadas todas as amostras do trabalho de forma conjunta, o gênero *Cetobacterium* foi bem prevalente tanto nas amostras de fezes (**Figura 6**) quanto de mucosas (**Figura 7**).

Na análise conjunta de mucosa e fezes, 61 OTUs estiveram mais associados a amostras de animais infectados quando comparados a animais saudáveis (**Tabela 4**). De forma semelhante, a análise isolada de fezes revelou 19 táxons bacterianos mais abundantes em fezes de animais do grupo infectado quando comparados aos animais controle (**Tabela 5**). A mesma tendência foi observada nos táxons associados apenas a mucosa, onde 39 estiveram mais associados a mucosa dos animais desafiados comparados ao grupo controle (**Tabela 6**). Não houve associação com amostras de animais saudáveis.

Quando comparadas as amostras de fezes e mucosas, o gênero *Streptococcus* (OTU_3) estava mais de 8.000 vezes mais abundante no grupo infectado em comparação ao grupo saudável (**Tabela 4**). A mesma tendência foi observada quando analisadas somente as amostras fecais (mais de 4.000 vezes). Entretanto, ao analisar as amostras de mucosa, o grupo infectado apresentava somente cerca de 500 vezes mais abundância do OTU_3.

O gênero *Bacillus* (OTU_56) também foi mais abundante em amostras fecais (mais de 400 vezes) do que em amostras da mucosa (cerca de 15 vezes) do grupo infectado, quando comparado aos controles.

Outros gêneros mostraram abundância semelhante entre amostras de fezes, amostras de mucosa e amostras de fezes e mucosa combinadas. Com *Lactobacillus* spp. (OTU_4) *Pleisomonas* (OTU_5) e *Aeromonas* (OTU_31), a abundância de animais infectados em relação aos controles variou, respectivamente, de 249,2 a 524,37 vezes, de 9,01 a 12,3 vezes e de 13,96 a 47,84 vezes.

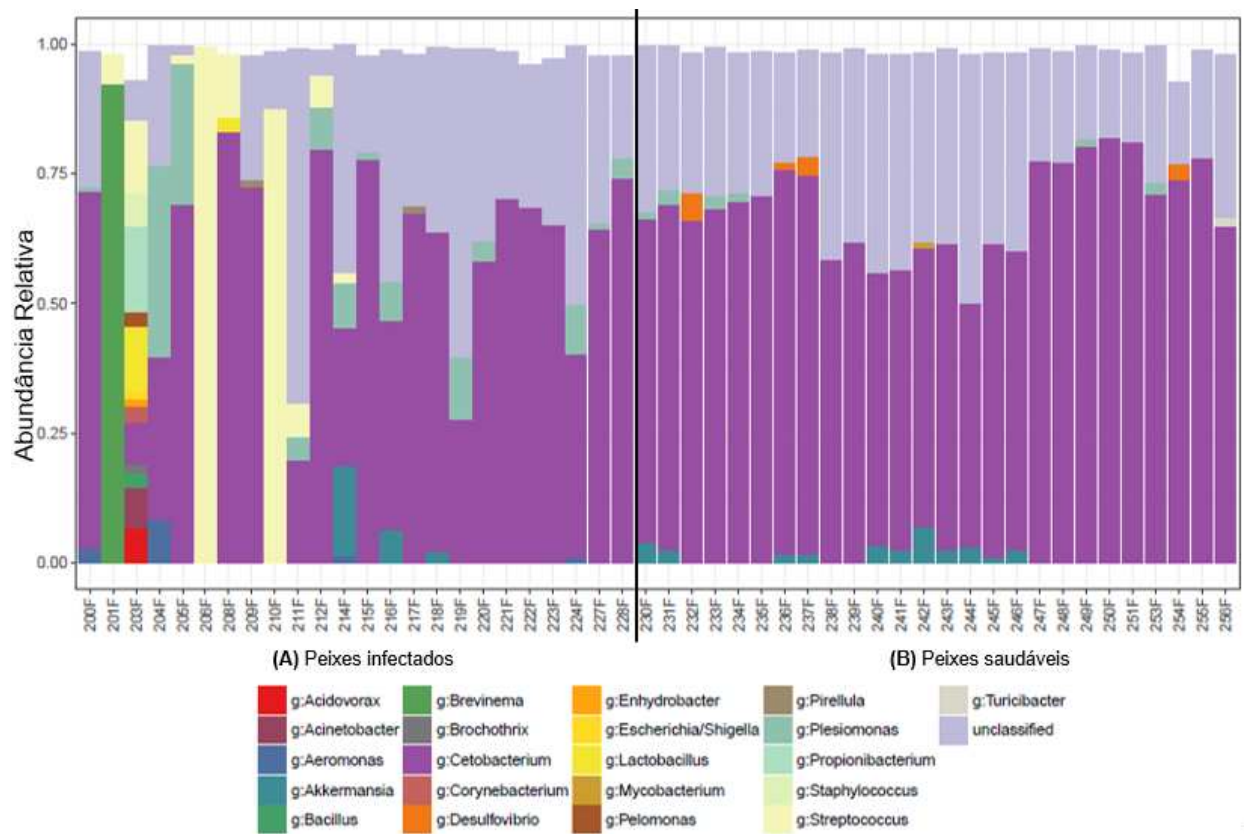


Figura 10. Gêneros bacterianos em amostras de fezes. Gêneros bacterianos em amostras de fezes de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

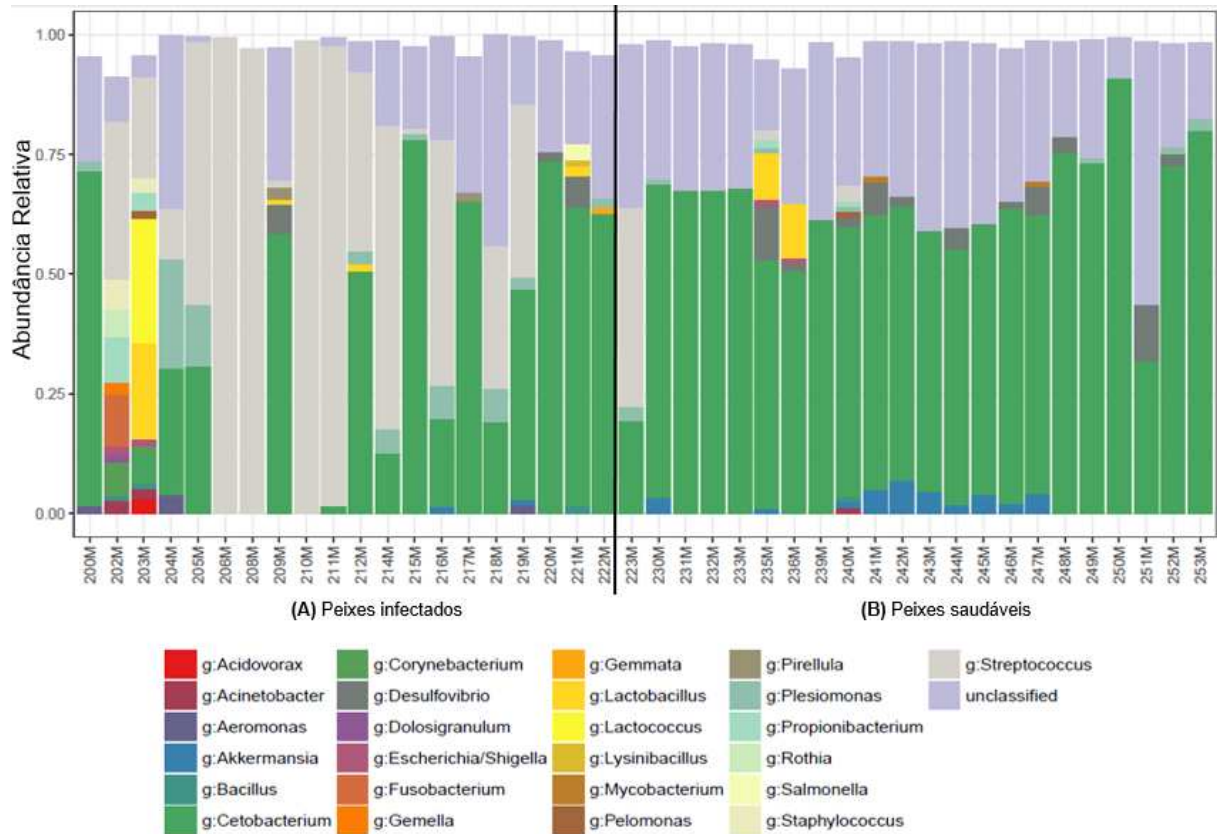
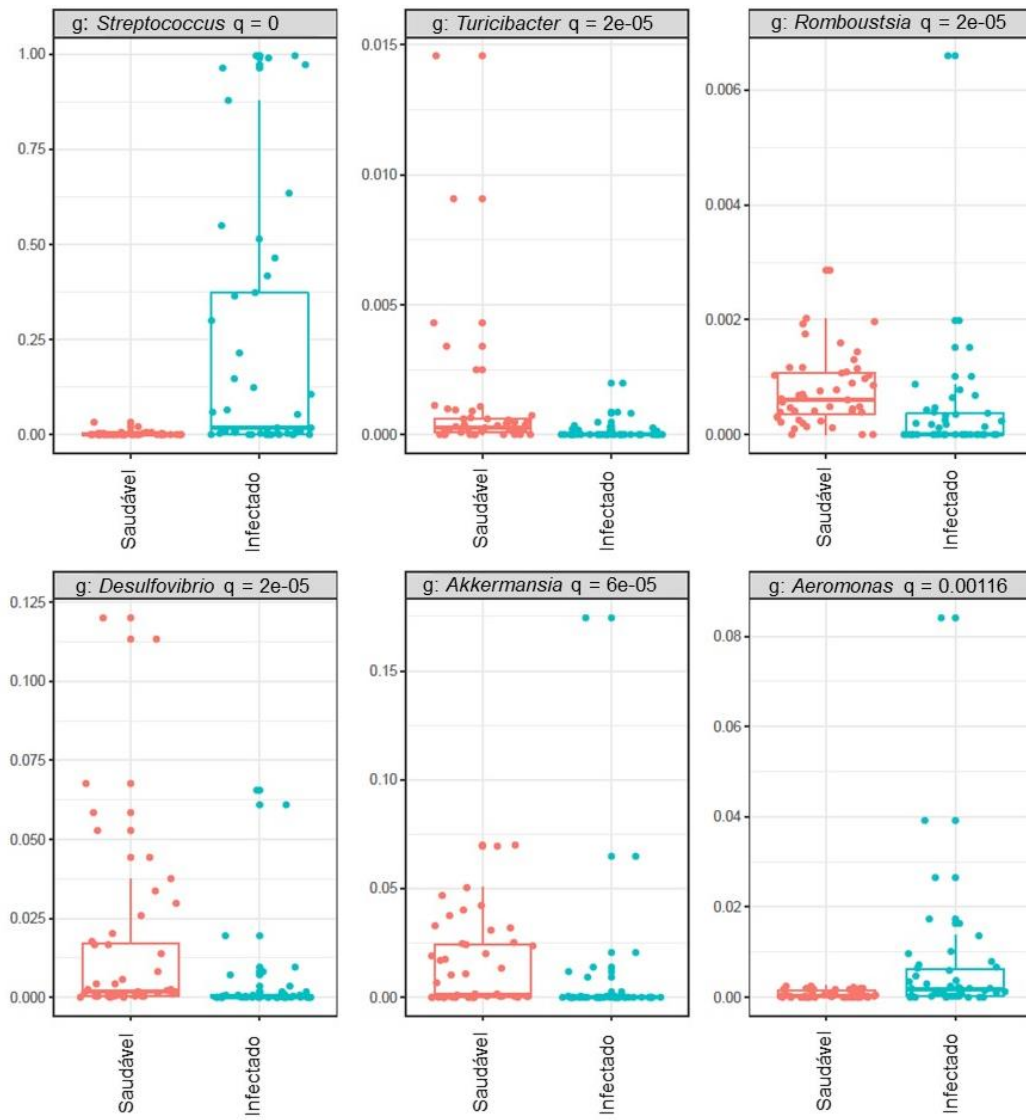
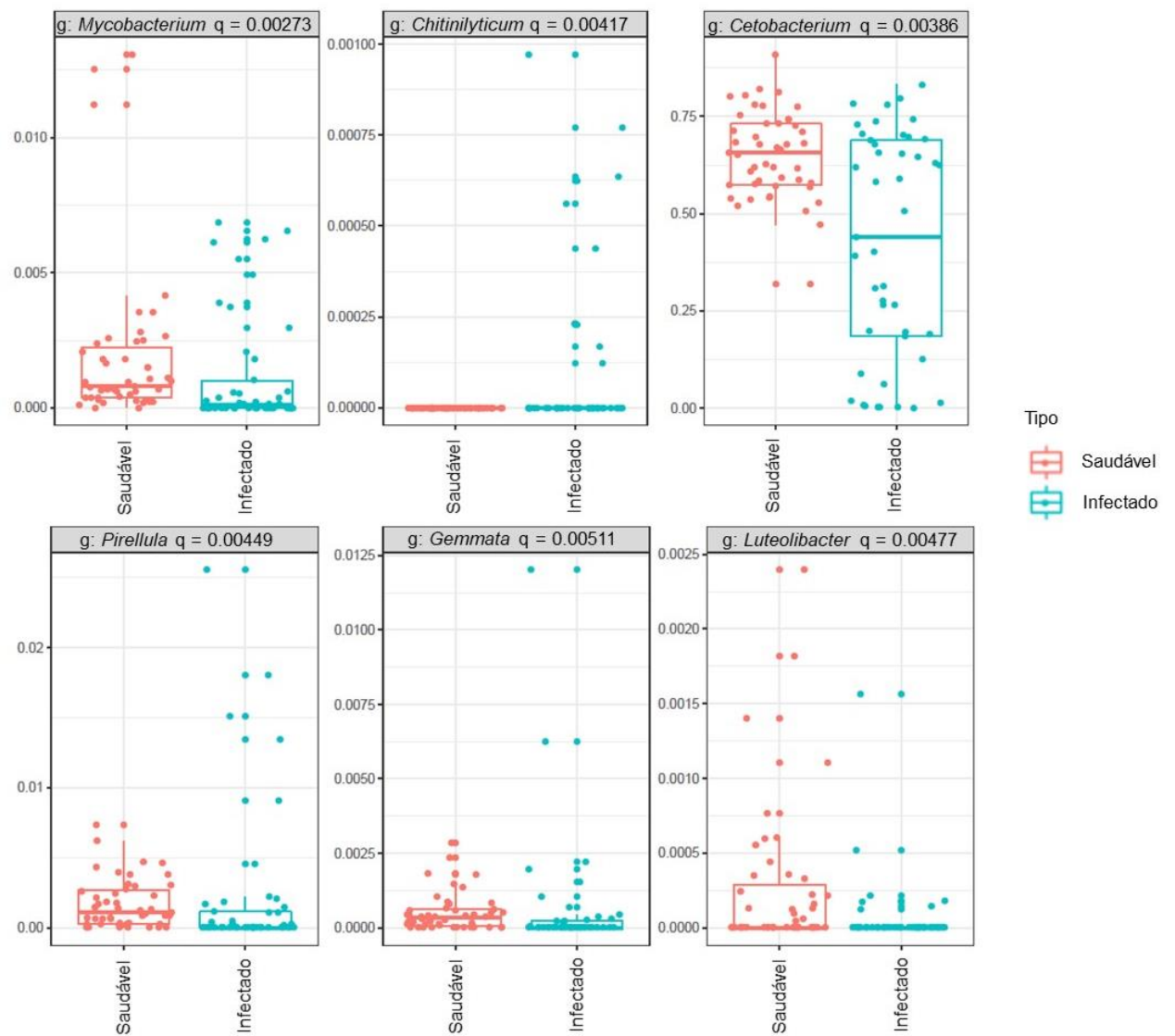


Figura 11. Gêneros bacterianos em amostras de mucosa. Gêneros bacterianos em amostras de mucosa de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

Ao analisar estatisticamente os gêneros identificados em relação a sua presença nos grupos de peixes saudáveis e peixes infectados, obteve-se que os gêneros que foram estatisticamente significativos ($q < 0,05$) entre os dois grupos foram: *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Romboutsia*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia*, *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Chitinilyticum*, *Cetobacterium*, *Pirellula*, *Gemmata*, *Luteolibacter*, *Lactobacillus*, um gênero não classificado, *Paenibacillus* e *Aquisphaera*. Os q-valores e a distribuição das amostras de ambos os grupos são apresentados na **Figura 12**.





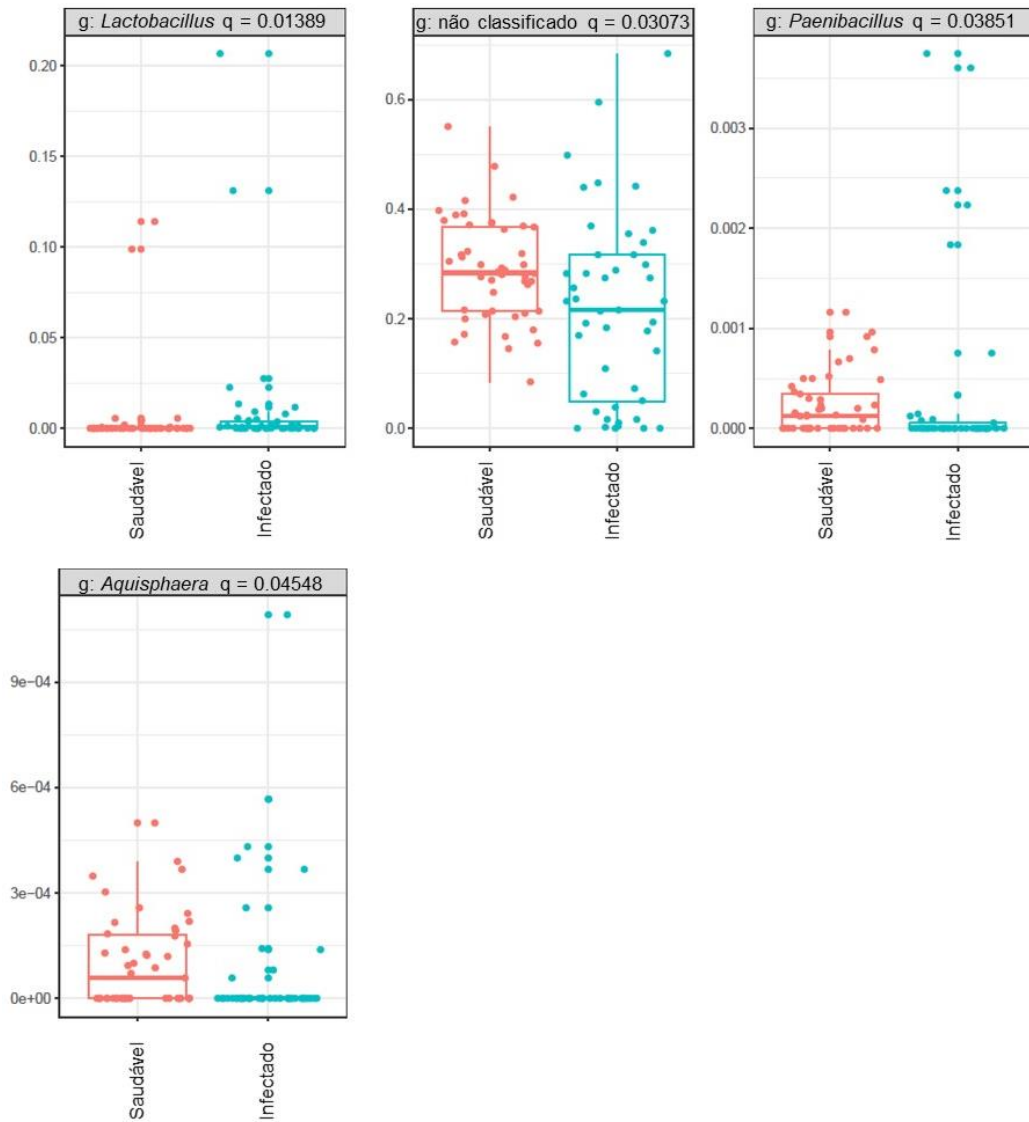


Figura 12. Distribuição de gêneros por grupo amostral. Distribuição gráfica com base na presença relativa normalizada (q-valor) do gênero em cada amostra de peixes saudáveis e peixes infectados. Amostras em vermelho referentes a peixes saudáveis. Amostras em azul referente a peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae*.

Tabela 4. Microbiota intestinal de peixes infectados. Micro-organismos mais abundantes na microbiota (Fezes e Mucosa) de peixes infectados comparados ao controle ($p < 0.01$).

Identificação do táxon	Abundância (Fold Change)	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
OTU_3	8102,39	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
OTU_4	524,37	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus
OTU_5	12,31	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Plesiomonas
OTU_7	30,70	Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Brevinemataceae	Brevinema
OTU_13	87,25	Bacteria	Bacteroidetes	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_14	56,22	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia/Shigella
OTU_23	114,07	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium
OTU_24	2,79	Bacteria	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_26	5,94	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_29	3,27	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	classified	unclassified	unclassified
OTU_30	56,62	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
OTU_31	47,84	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas
OTU_37	71,62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_40	11,00	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_43	84,21	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pelomonas
OTU_44	8,79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas

OTU_46	77,95	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
OTU_48	130,38	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>
OTU_49	4,59	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctopirus</i>
OTU_51	11,13	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_53	53,73	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	unclassified	unclassified
OTU_54	5,47	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_56	60,59	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae_1</i>	<i>Bacillus</i>
OTU_58	9,56	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_61	10,61	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_62	38,21	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>
OTU_65	3,62	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>
OTU_68	26,41	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_69	3,79	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_71	7,16	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_73	288,21	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Enhydrobacter</i>
OTU_75	119,63	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
OTU_77	4,77	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_84	12,89	<i>Bacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria_Gp16</i>	<i>Gp16</i>	unclassified	unclassified
OTU_86	8,51	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_88	111,73	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_99	5,56	<i>Bacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_105	6,73	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_107	11,31	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Conexibacteraceae</i>	<i>Conexibacter</i>

OTU_109	214,27	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium
OTU_117	32,72	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	Rubrobacter
OTU_121	4,59	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_123	6,46	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_127	14,77	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Neochlamydia
OTU_140	87,96	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
OTU_144	44,26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
OTU_153	549,73	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	unclassified	unclassified
OTU_163	47,48	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	unclassified
OTU_165	6,08	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiia	Chlamydiales	Parachlamydiaceae	unclassified
OTU_166	165,84	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	unclassified
OTU_168	17,64	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Chitinilyticum
OTU_171	23,89	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax
OTU_172	15,19	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	unclassified	unclassified
OTU_274	90,51	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
OTU_287	54,13	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia
OTU_295	39,97	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
OTU_352	5,31	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_401	6,34	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	unclassified	unclassified
OTU_430	3,00	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp16	Gp16	unclassified	unclassified
OTU_434	10,56	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	unclassified	unclassified
OTU_482	140,04	Bacteria	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

Tabela 5. Microbiota das fezes de peixes infectados. Microorganismos mais abundantes em fezes de peixes infectados comparados ao controle ($p < 0.01$).

Identificação do táxon	Abundância (Fold Change)	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
	4499,7						
OTU_3	7	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
OTU_4	249,27	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus
OTU_5	11,06	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Plesiomonas
OTU_13	27,26	Bacteria	Bacteroidetes	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_14	482,04	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia/Shigella
OTU_23	283,07	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium
OTU_31	56,59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas
OTU_37	65,81	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_43	235,74	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pelomonas
OTU_51	14,68	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_54	16,02	Bacteria	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_56	412,38	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus
OTU_58	6,81	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unclassified
OTU_88	199,92	Bacteria	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

	1775,7						
OTU_153	0	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	unclassified	unclassified
OTU_401	7,85	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	unclassified	unclassified
OTU_434	18,63	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	unclassified	unclassified
OTU_482	83,26	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_525	3,99	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified

Tabela 6. Microbiota da mucosa de peixes infectados. Microorganismos mais abundantes em mucosa de peixes infectados comparados ao controle ($p < 0.01$).

Identificação do táxon	Abundância (Fold Change)	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
OTU_3	494,62	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
OTU_4	316,94	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
OTU_5	9,01	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Plesiomonas</i>
OTU_7	21,78	<i>Bacteria</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Brevinemataceae</i>	<i>Brevinema</i>
OTU_12	351,79	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
OTU_13	33,01	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_14	43,04	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia/Shigella</i>
OTU_17	72,85	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>
OTU_23	49,32	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
OTU_26	22,36	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_29	14,19	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_31	13,96	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>
OTU_43	34,30	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>
OTU_44	15,74	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>
OTU_46	36,43	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
OTU_49	9,80	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctopirus</i>

OTU_53	37,62	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	unclassified	unclassified
OTU_56	15,72	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae_1</i>	<i>Bacillus</i>
OTU_59	22,64	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
OTU_61	37,41	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_62	569,88	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>
OTU_71	23,17	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_73	33,89	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Enhydrobacter</i>
OTU_74	16,11	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae_1</i>	<i>Bacillus</i>
OTU_75	62,29	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
OTU_86	21,11	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_88	43,13	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_94	9,37	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Aquisphaera</i>
OTU_105	21,04	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_107	34,63	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Conexibacteraceae</i>	<i>Conexibacter</i>
OTU_113	9,20	<i>Bacteria</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	unclassified
OTU_153	140,44	<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	unclassified	unclassified
OTU_163	103,11	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	unclassified
OTU_166	146,66	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>
OTU_274	157,63	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
OTU_295	124,88	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
OTU_401	4,03	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	unclassified	unclassified
OTU_482	105,56	<i>Bacteria</i>	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified
OTU_508	620,47	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>

5. DISCUSSÃO

As infecções por *S. agalactiae* podem causar significantes perdas de produção na tilapicultura. Nesse contexto, no presente trabalho, procuramos estabelecer e comparar a microbiota bacteriana de peixes saudáveis e peixes experimentalmente infectados com *S. agalactiae*. Além de seu papel na saúde animal, há relato de um provável potencial zoonótico de *S. agalactiae* em humanos associado ao consumo de peixe cru (TAN; LIN; FOO; KOH *et al.*, 2016)

A diminuição da diversidade bacteriana intestinal nas fezes (MANICHANH; RIGOTTIER-GOIS; BONNAUD; GLOUX *et al.*, 2006; SCANLAN; SHANAHAN; O'MAHONY; MARCHESI, 2006) e mucosa (OTT; MUSFELDT; WENDEROTH; HAMPE *et al.*, 2004) sob condições patológicas já foi descrita anteriormente. CHANG *et al* (2008) relataram uma diminuição da diversidade microbiana nas fezes de pacientes humanos sob infecção por *Clostridium difficile*. Da mesma forma SEPEHRI *et al* (2007) relataram menor diversidade microbiana em pacientes com doença inflamatória intestinal. Portanto, a diminuição da diversidade encontrada neste trabalho mostra que a mesma tendência ocorre nos peixes. É possível que a infecção modifique o ambiente no intestino, favorecendo um número menor de competidores bacterianos. Além disso, a redução na abundância relativa de alguns gêneros em peixes doentes pode estar relacionada à disponibilidade de nutrientes da dieta no intestino dos peixes durante o período da doença.

Nossos resultados apontam alpha diversidade menor entre os dois grupos experimentais, animais doentes comparados aos animais saudáveis, realizado através do índice de Chao1 e análise do número médio de OTUs. O índice de Shannon, por sua vez, não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais. Esse resultado pode estar relacionado a riqueza das amostras, a qual exerce influência direta neste índice. Nesse sentido, BOBROWSKI *et al* (2016) demonstraram que o índice de Shannon apresentou redução no seu valor à medida em que se diminuiu a riqueza específica (quantidade de espécies nas amostras). No entanto, a diminuição da riqueza em amostras do grupo infectado encontrada nesta pesquisa, evidenciada pelo índice de Chao1, que leva em consideração a abundância de OTUs, pode não ter sido suficiente para influenciar o índice de Shannon.

Assim como relatado neste estudo menor diversidade em amostras do grupo infectado comparado a amostras do grupo controle, resultado semelhante foi descrito

anteriormente por LI *et al* (2016, 2017) ao analisar microbiota intestinal de peixes com furunculose ou com doença “*red-operculum*”. Mas de maneira oposta ao observado em carpas capim (*Ctenopharyngodon idellus*) com doença intestinal (TRAN; ZHANG; XIONG; WANG *et al.*, 2018). Tais diferenças podem estar relacionadas ao tipo de doença, espécie e condição do hospedeiro.

Os filos mais abundantes em ambos os grupos descritos neste trabalho condizem com os achados de TRAN *et al.* (2018) que descreveram *Firmicutes* e *Proteobacteria* como aquelas mais associados a carpas saudáveis e com doença intestinal. Tais filos também são descritos como componentes da microbiota intestinal de tilápias, além de *Actinobacteria* (FAN; CHEN; MENG; SONG *et al.*, 2017). Isso mostra que, embora haja diminuição da variabilidade na taxonomia mais específica (gênero), ela não acontece na taxonomia mais geral (filo).

A formação da microbiota gastrointestinal em peixes tem início logo após a eclosão e se conclui dentro de algumas horas (FULLER, 1992). Assim sendo, a população bacteriana é o principal componente da microbiota intestinal em peixes (POND; STONE; ALDERMAN, 2006; SPANGGAARD; HUBER; NIELSEN; NIELSEN *et al.*, 2000). É sabido que a composição microbiana intestinal de peixes marinhos e peixes de água doce divergem entre si, na qual os gêneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, membros da família *Enterobacteriaceae*, bactérias anaeróbias como *Bacteroides*, *Clostridium* e *Fusobacterium* além de Bactérias do ácido Láctico (BAL) caracterizam a composição da microbiota intestinal de peixes de água doce (HUBER; SPANGGAARD; APPEL; ROSSEN *et al.*, 2004; KIM; BRUNT; AUSTIN, 2007). Alguns desses gêneros, como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Clostridium* e membros da família *Enterobacteriaceae* também foram encontrados neste estudo no intestino de peixes em diferentes proporções, mas sem diferença estatística significativa entre os animais saudáveis e os infectados.

O gênero *Cetobacterium* está entre os gêneros mais prevalentes entre as amostras analisadas. O gênero é descrito como predominante no intestino de diversas espécies de peixes de água doce, como *Arapaima giga*, *Lepomis macrochirus*, *Micropterus salmoides* e *Ictalurus punctatus* (LARSEN; MOHAMMED; ARIAS, 2014; RAMÍREZ; CORONADO; SILVA; ROMERO, 2018) bem como no intestino de tilápias do nilo (TSUCHIYA; SAKATA; SUGITA, 2008). Também nomeado como *Bacteroides* tipo A, o gênero *Cetobacterium* tem sido relacionado com a produção de vitamina B-

12 no intestino de peixes, ao qual sua presença no intestino está diretamente relacionada a não necessidade de ingestão da vitamina na dieta, ao passo que, em peixes em que a bactéria não foi detectada a ingestão de vitamina B-12 na dieta é necessária (SUGITA; MIYAJIMA; DEGUCHI, 1991). Visto que em humanos, a vitamina B-12 desempenha papel significativo na síntese de ácidos graxos e na imunomodulação de linfócitos T e citocinas (SAKANE; TAKADA; KOTANI; TSUNEMATSU, 1982; YAMASHIKI; NISHIMURA; KOSAKA, 1992).

Em relação ao gênero *Chitinilyticum*, encontrado exclusivamente em algumas amostras do grupo infectado, poucos relatos estão disponíveis na literatura sobre o gênero. CHANG *et al* (2007) isolaram a cepa c14T da superfície de um lago de água doce no sul de Taiwan, e sugerem a classificação da cepa, de acordo com análises bioquímicas, fisiológicas, quimiotaxonômicas e filogenéticas, em um novo gênero e espécie. Portanto, estudos que relacionem a presença do gênero bacteriano no intestino de peixes são necessários para entender o seu papel no intestino sob condições infecciosas.

O patógeno de peixes *Aeromonas* spp. foi encontrado em maior abundância em amostras do grupo infectado, de forma similar ao relatado anteriormente por LI *et al* (2016). Tal gênero é relacionado à indução da inflamação intestinal em carpas (*Ctenopharyngodon idella*) (SONG; ZHAO; BO; LIU *et al.*, 2014). Ele é responsável por muitos surtos na piscicultura (BEBAK; WAGNER; BURNES; HANSON, 2015; PASQUALE; BALODA; DUMONTET; KROVACEK, 1994), causando septicemia em tilápias do Nilo (YARDIMCI; AYDIN, 2011). Um aumento de gêneros patogênicos sugere que tais organismos podem desempenhar um papel ativo na progressão da doença (TRAN; ZHANG; XIONG; WANG *et al.*, 2018).

A meningoencefalite, uma das principais características da infecção por *S. agalactiae* em tilápias (SALVADOR; MULLER; FREITAS; LEONHARDT *et al.*, 2005), é caracterizada por disseminação conjunta e penetração da barreira hematoencefálica do pescado. Assim, a disseminação da bactéria pelo organismo do hospedeiro pode justificar a menor abundância de *Streptococcus* spp identificada na mucosa em comparação às amostras de fezes de peixes doentes, no qual a bactéria não limitou a sua proliferação somente ao local inicial de infecção.

As bactérias ácido-láticas compõem a maior parte das bactérias intestinais em mamíferos (TUOHY; PROBERT; SMEJKAL; GIBSON, 2003; YAN; POLK, 2011), e

são relatadas também como habitantes da microbiota intestinal de peixes saudáveis (RINGØ; GATESOUBE, 1998), nos quais sua população pode variar de acordo com o ambiente aquático adjacente. Foi demonstrado que a população de BAL varia de acordo com estações do ano, e consequentemente a eventuais alterações de temperaturas na água (AL-HARBI; UDDIN, 2004; IRIANTO; AUSTIN, 2002). Nossos resultados demonstraram que *Lactobacillus* spp. e os probióticos *Bacillus* spp. foram mais associados a fezes e mucosas de animais doentes quando comparados a animais saudáveis. Foi observado um comportamento semelhante tanto em uma meta-análise que relatou proliferação de *Lactobacillus* em pacientes com doença inflamatória intestinal (doença de Crohn) (HEENEY; GAREAU; MARCO, 2018) quanto em um estudo que demonstrou abundância de *Bacillus* em carpas (*Ctenopharyngodon idellus*) doentes (TRAN *et al.*, 2018). A proliferação de bactérias “benéficas”, como BAL e probióticos, durante a doença, pode ser uma tentativa do hospedeiro de modular a população bacteriana para combater a infecção. Esse tipo de interação foi relatado anteriormente em mamíferos infectados com *E. coli* patogênica, onde a atividade bacteriana foi modulada por sinais derivados do hospedeiro (PACHECO; CURTIS; RITCHIE; MUNERA *et al.*, 2012).

Nesse cenário, a proliferação de patógenos oportunistas pode causar doenças no hospedeiro. Assim, a presença de *Streptococcus* no intestino de alguns peixes saudáveis, como evidenciado pelo presente estudo, sugere que a estreptococose em tilápias do Nilo provavelmente se desenvolva a partir de uma proliferação oportunista dessas bactérias. Isso é consistente com um estudo de POND *et al* (2006), que confirmaram que o intestino de peixes é um reservatório para muitos patógenos oportunistas e apoiado por TRAN *et al* (2018), que também identificaram um aumento significativo de bactérias oportunistas consideradas patógenos de carpa no intestino de carpas doente (*Ctenopharyngodon idellus*). Essa condição está relacionada ao fato de que a diversidade intestinal é crítica para preservar a estabilidade e a dinâmica do hospedeiro (CLARKE; MURPHY; O'SULLIVAN; LUCEY *et al.*, 2014). Sua diminuição pode representar vulnerabilidade a patógenos e dificuldade no combate a infecções.

Os benefícios proporcionados pela microbiota intestinal são bem definidos em mamíferos, tanto na nutrição, quanto na competitividade, imunidade, homeostase e saúde do hospedeiro como um todo. No entanto, apesar da presença da microbiota intestinal em peixes ter sido reconhecida, sua diversidade, importância, papel na

nutrição e saúde do pescado ainda não está bem elucidada. Este trabalho mostrou que a infecção experimental com um patógeno (*S. agalactiae*) levou a diminuição da variabilidade da microbiota. Os resultados aqui apresentados podem ser úteis em futuros esquemas de prevenção e tratamento da estreptococose em peixes.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo permitiram observar que a microbiota intestinal de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *S. agalactiae* tem uma composição bacteriana que diverge entre si. Os resultados obtidos ao longo desse trabalho sugerem que:

- A composição da microbiota intestinal (fezes e mucosa) identificada em peixes saudáveis possui mais espécies bacterianas por amostra e é mais diversa quando comparada com a microbiota intestinal (fezes e mucosa) de peixes infectados com *S. agalactiae*.
- A presença da infecção por *S. agalactiae* em tilápias do Nilo altera a microbiota residente, levando a um favorecimento da predominância de determinados gêneros bacterianos *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Pleisomonas* em relação a outros.
- A presença da infecção por *S. agalactiae* em tilápias diminuiu significativamente a população do gênero *Cetobacterium* no intestino (fezes e mucosa) de peixes infectados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HARBI, A. H.; UDDIN, M. N. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture**, 229, n. 1-4, p. 37-44, 2004.

ALI, A.; HASSAN, D.; SALEHA, A. A.; SITI, K. B. *et al.* Streptococcus agalactiae the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.

BEBAK, J.; WAGNER, B.; BURNES, B.; HANSON, T. Farm size, seining practices, and salt use: risk factors for *Aeromonas hydrophila* outbreaks in farm-raised catfish, Alabama, USA. **Preventive veterinary medicine**, 118, n. 1, p. 161-168, 2015.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, 58, n. 1, p. 1, 2005.

BOBROWSKI, R.; BIONDI, D. Comportamento de Índices de Diversidade na Composição da Arborização de Ruas. **Floresta e Ambiente**, 23, n. 4, p. 475-486, 2016.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

CHANG, J. Y.; ANTONOPOULOS, D. A.; KALRA, A.; TONELLI, A. *et al.* Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*—associated diarrhea. **The Journal of infectious diseases**, 197, n. 3, p. 435-438, 2008.

CHANG, P. a.; PLUMB, J. Histopathology of experimental Streptococcus sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, 19, n. 3, p. 235-241, 1996.

CHANG, S.-C.; CHEN, W.-M.; WANG, J.-T.; WU, M.-C. Chitinolyticum aquatile gen. nov., sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from a freshwater pond used for Pacific white shrimp culture. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57, n. 12, p. 2854-2860, 2007.

CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; O'SULLIVAN, O.; LUCEY, A. J. *et al.* Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**, 63, n. 12, p. 1913-1920, 2014.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, 42, n. D1, p. D633-D642, 2013.

COLLINS, F. S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. **Science**, 300, n. 5617, p. 286-290, 2003.

DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, 14, n. 6, p. 927-930, 2003.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. Streptococcus shiloi and streptococcus difficile: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, 28, n. 3, p. 139-143, 1994.

ELDAR, A. a.; GHITTINO, C. Lactococcus garvieae and Streptococcus iniae infections in rainbow trout Oncorhynchus mykiss: similar, but different diseases. **Diseases of aquatic organisms**, 36, n. 3, p. 227-231, 1999.

ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R.; RICHTER, C. B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. **Journal of Clinical Microbiology**, 28, n. 3, p. 628-630, 1990.

EVANS, J.; KLESIUS, P.; GILBERT, P.; SHOEMAKER, C. *et al.* Characterization of β -haemolytic Group B Streptococcus agalactiae in cultured seabream, Sparus auratus L., and wild mullet, Liza klunzingeri (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, 25, n. 9, p. 505-513, 2002.

FAN, L.; CHEN, J.; MENG, S.; SONG, C. *et al.* Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (Oreochromis niloticus) pond systems during the peak period of breeding. **Aquaculture research**, 48, n. 2, p. 459-472, 2017.

FULLER, R. History and development of probiotics. *In*: **Probiotics**: Springer, 1992. p. 1-8.

HEENEY, D. D.; GAREAU, M. G.; MARCO, M. L. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? **Current opinion in biotechnology**, 49, p. 140-147, 2018.

HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K.; ROSSEN, L. *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, 96, n. 1, p. 117-132, 2004.

IREGUI, C.; COMAS, J.; VÁSQUEZ, G.; VERJAN, N. Experimental early pathogenesis of *S treptococcus agalactiae* infection in red tilapia *O reochromis* spp. **Journal of fish diseases**, 39, n. 2, p. 205-215, 2016.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of fish diseases**, 25, n. 11, p. 633-642, 2002.

KIM, D. H.; BRUNT, J.; AUSTIN, B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of applied microbiology**, 102, n. 6, p. 1654-1664, 2007.

KLESIOUS, P.; SHOEMAKER, C.; EVANS, J., 2008, **Streptococcus: a worldwide fish health problem**. 83-107.

LARSEN, A.; MOHAMMED, H.; ARIAS, C. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. **Journal of applied microbiology**, 116, n. 6, p. 1396-1404, 2014.

LI, T.; LI, H.; GATESOUBE, F.-J.; SHE, R. *et al.* Bacterial signatures of “Red-Operculum” disease in the gut of crucian carp (*Carassius auratus*). **Microbial ecology**, 74, n. 3, p. 510-521, 2017.

LI, T.; LONG, M.; JI, C.; SHEN, Z. *et al.* Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis. **Scientific reports**, 6, p. 30606, 2016.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature reviews microbiology**, 12, n. 10, p. 661-672, 2014.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, 55, n. 2, p. 205-211, 2006.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Human microbiome analysis. **PLoS Comput Biol**, 8, n. 12, p. e1002808, 2012.

MUSA, N.; WEI, L. S.; MUSA, N.; HAMDAN, R. H. *et al.* Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, 40, n. 5, p. 630-632, 2009.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture**, 198, n. 3-4, p. 229-236, 2001.

OTT, S.; MUSFELDT, M.; WENDEROTH, D.; HAMPE, J. *et al.* Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, 53, n. 5, p. 685-693, 2004.

PACHECO, A. R.; CURTIS, M. M.; RITCHIE, J. M.; MUNERA, D. *et al.* Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. **Nature**, 492, n. 7427, p. 113, 2012.

PASQUALE, V.; BALODA, S. B.; DUMONTET, S.; KROVACEK, K. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, n. 5, p. 1678-1680, 1994.

PEIXE, B. Anuário da Piscicultura 2019. **Peixe BR–Associação Brasileira da Piscicultura, São Paulo**, 2019.

PEREIRA, U.; MIAN, G.; OLIVEIRA, I.; BENCHETRIT, L. *et al.* Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary microbiology**, 140, n. 1-2, p. 186-192, 2010.

PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M. *et al.* Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary immunology and immunopathology**, 113, n. 3-4, p. 339-347, 2006.

PIRARAT, N.; PINPIMAI, K.; RODKHUM, C.; CHANSUE, N. *et al.* Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. **Animal Feed Science and Technology**, 207, p. 93-103, 2015.

POND, M. J.; STONE, D. M.; ALDERMAN, D. J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 261, n. 1, p. 194-203, 2006.

PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. d.; SILVA, V. G. d. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53, n. 1, p. 87-92, 2010.

PULIDO, A.; IREGUI, C.; FIGUEROA, J.; KLESIUS, P. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. **Revista AquaTIC**, n. 20, 2016.

RAMÍREZ, C.; CORONADO, J.; SILVA, A.; ROMERO, J. *Cetobacterium* is a major component of the microbiome of giant amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. **Animals**, 8, n. 11, p. 189, 2018.

RINGØ, E.; GATESOUPÉ, F.-J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, 160, n. 3-4, p. 177-203, 1998.

RODRIGUES, L. S.; CAVALCANTI, I. M.; CAPANEMA, L. X. d. L.; MORCH, R. B. *et al.* Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 421-463, 2012.

SAKANE, T.; TAKADA, S.; KOTANI, H.; TSUNEMATSU, T. Effects of methyl-b 12 on their *in vitro* immune functions of human T lymphocytes. **Journal of clinical immunology**, 2, n. 2, p. 101-109, 1982.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. d.; LEONHARDT, J. H. *et al.* Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, 35, n. 6, p. 1374-1378, 2005.

SCANLAN, P. D.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, C.; MARCHESI, J. R. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. **Journal of clinical microbiology**, 44, n. 11, p. 3980-3988, 2006.

SEPEHRI, S.; KOTLOWSKI, R.; BERNSTEIN, C. N.; KRAUSE, D. O. Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, 13, n. 6, p. 675-683, 2007.

SITI-ZAHRAH, A.; PADILAH, B.; AZILA, A.; RIMATULHANA, R. *et al.* Multiple streptococcal species infection in cage-cultured red tilapia but showing similar clinical signs. **Diseases in Asian Aquaculture VI. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society**, 2008, p. 313-320, 2008.

SONG, X.; ZHAO, J.; BO, Y.; LIU, Z. *et al.* *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an experimental model. **Aquaculture**, 434, p. 171-178, 2014.

SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; NIELSEN, T. *et al.* The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. **Aquaculture**, 182, n. 1-2, p. 1-15, 2000.

SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture**, 92, p. 267-276, 1991.

TAN, S.; LIN, Y.; FOO, K.; KOH, H. F. *et al.* Group B Streptococcus serotype III sequence type 283 bacteremia associated with consumption of raw fish, Singapore. **Emerging infectious diseases**, 22, n. 11, p. 1970, 2016.

TRAN, N. T.; ZHANG, J.; XIONG, F.; WANG, G. T. *et al.* Altered gut microbiota associated with intestinal disease in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **World J Microbiol Biotechnol**, 34, n. 6, p. 71, May 18 2018.

TSUCHIYA, C.; SAKATA, T.; SUGITA, H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. **Letters in applied microbiology**, 46, n. 1, p. 43-48, 2008.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug discovery today**, 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

WANG, B.; GAN, Z.; WANG, Z.; YU, D. *et al.* Integrated analysis neurimmiRs of tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in immune response to *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing meningoencephalitis in teleosts. **Fish & shellfish immunology**, 61, p. 44-60, 2017.

WU, Y.-r.; GONG, Q.-f.; FANG, H.; LIANG, W.-w. *et al.* Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

YAMASHIKI, M.; NISHIMURA, A.; KOSAKA, Y. Effects of methylcobalamin (vitamin B12) on in vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells. **Journal of clinical & laboratory immunology**, 37, n. 4, p. 173-182, 1992.

YAN, F.; POLK, D. Probiotics and immune health. **Current opinion in gastroenterology**, 27, n. 6, p. 496, 2011.

YARDIMCI, B.; AYDIN, Y. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 58, n. 1, p. 47-54, 2011.

YU, L.; QIAO, N.; LI, T.; YU, R. *et al.* Dietary supplementation with probiotics regulates gut microbiota structure and function in Nile tilapia exposed to aluminum. **PeerJ**, 7, p. e6963, 2019.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, 143, n. 2-3, p. 227-229, 2010.

8. ANEXO

8.1 Declaração da Comissão de Ética do Uso de animais



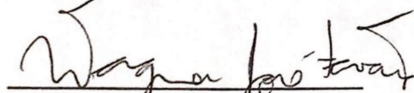
CERTIFICADO

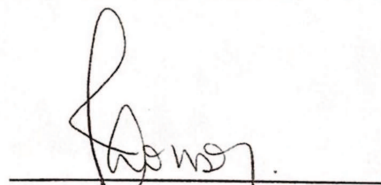
Certificamos que a proposta intitulada **Comparação entre a microbioma intestinal de peixes saudáveis e peixes infectados experimentalmente com *Streptococcus agalactiae***, registrada com o nº **4817-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira e Renato Pariz Maluta**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **16 de abril de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/03/2018-29/02/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/04/2018-29/02/2020
Espécie / linhagem/ raça:	peixes
No. de animais:	96
Idade/Peso:	04 semanas / 50g
Sexo:	48 machos / 48 fêmeas
Origem:	Adquiridos comercialmente
Biotério onde serão mantidos os animais:	Não se aplica

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 16 de abril de 2018.


 Prof. Dr. Wagner José Fávares
 Coordenador


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

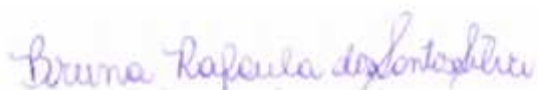
8.2 Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **COMPARAÇÃO ENTRE O MICROBIOMA INTESTINAL DE PEIXES SADIOS E PEIXES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM STREPTOCOCCUS AGALACTIAE**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de janeiro de 2020

Assinatura .



Nome do(a) autor(a): **Bruna Rafaela dos Santos Silva**

RG n.º 49.807.228-9

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Wanderley Dias da Silveira**

RG n.º 8550355