



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A INFLUÊNCIA DO MICROBIOMA INTESTINAL NA
PERFORMANCE DE CRESCIMENTO EM JUVENIS DE
DOURADA (*Sparus aurata*)

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz, Doutora Cátia Lourenço Marques e Professora Doutora Florbela Maria Benjamin Soares.

TOMÁS MARTINS HOMEM, Nº 21702765

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A INFLUÊNCIA DO MICROBIOMA INTESTINAL NA
PERFORMANCE DE CRESCIMENTO EM JUVENIS DE
DOURADA (*Sparus aurata*)

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 10/10/2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 968/2024, de 30 de setembro, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Eduardo Marcelino

Arguente: Professor Doutor Rodrigo Costa (Instituto Superior Técnico)

Orientador: Professora Doutora Ana Munhoz

Este trabalho também foi orientado pela Doutora Cátia Marques (co-orientadora) e pela Professora Doutora Florbela Soares (orientadora externa).

TOMÁS MARTINS HOMEM, N.º 21702765

2024

www.lusofona.pt

À minha querida Mafalda Rocha

Agradecimentos

Dado por concluída esta dissertação, que não seria possível sem o pioneirismo e financiamento dos projetos NANOPEIXE (ALG-01-0247-FEDER-070032) e SAUDE&AQUA II (MAR-021.1.3-FEAMPA-00018), a quem agradeço e considero por toda a sua contribuição fundamental para o delineamento e execução do estudo realizado. Ao Doutor Pedro Pousão-Ferreira, investigador responsável pela Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), por me ter dado luz verde para integrar as suas instalações assim como a sua equipa, possibilitando-me crescer no mundo da investigação científica em aquacultura. À minha orientadora, Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz, que sabendo das minhas preferências e ambições curriculares, encaminhou-me com sensatez, para uma área de interesse e necessidade emergentes, no que diz respeito às funções do médico veterinário. Grato às minhas orientadoras, Doutora Cátia Lourenço Marques e Doutora Florbela Maria Benjamin Soares, por não deixarem desvanecer a necessidade de concluir este trabalho, e me fazerem perceber que no mundo da ciência só o método e a objetividade levam o barco a bom porto. Como não podia ser de outra forma, uma palavra especial à “Flor”, a quem me dirijo humildemente, obrigado hoje e sempre, pela preocupação constante e por me fazer sentir parte desta casa, desde o primeiro ao último dia. Aos meus pais, que mesmo longe, são os primeiros espectadores das minhas vitórias e derrotas. Que do meio do atlântico, esperam diariamente uma chamada sem hora marcada, que traga notícias do filho a quem deram a liberdade de nadar por todos os oceanos do mundo. A eles um obrigado sem tamanho nem media, vemo-nos muito em breve. Com toda a certeza que o próximo agradecimento impunha a necessidade de uma dissertação de gratidão, à Mafalda Rocha, que foi mãe, pai, cão e gato, que me aturou e tirou o mau humor dia sim, dia sim, e me fez ver que é na diferença que o Homem se constrói a cada dia que passa. Sem ela, a vida tinha muito menos cor e talvez seja mesmo por isso que o sol no Algarve brilhe mais. Incondicionalmente, tudo foi, é e será gratidão por este ser humano que vale por 7. À Leticia Luján, obrigado “à rainha da genética”, pelos meses que me deu do seu conhecimento, amizade e carinho. Com um carinho muito especial, agradeço à Carole, à Carolina e à Bárbara, ao “fareense” André, à Ana Calafate, ao Ivo, ao Joaquim, à Marisa, à Morgana, ao Ravi, ao Marcelo, à Andreia e a muitos mais nomes que contribuíram igualmente para este desfecho. Grato ao meu professor e “Pai”, Rúben Araújo, mais eficiente do que qualquer despertador, garantiu todos os dias que não me desviava do caminho, como se da encomenda de um vinil nosso se tratasse. Aos meus bons amigos Martim, Jean, Vasco, Guga, Bila, Inês, Carolinas (Almeida e Júnior), José engenheiro, Pontes, Nuninácio, Catarina e ao Rubito, por para além do amor, me darem ferramentas que me tornam cada vez mais polivalente. Por último, mas não menos importante, ao Tozé Diogo, por ser uma inspiração pela sua arte, integridade e forma de trabalhar todos os dias.



Vista aérea da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPMA onde foi realizado este trabalho.

Este trabalho foi financiado e realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do IPMA, utilizando infraestruturas e meios disponíveis para o cultivo de peixes, amostragens biológicas e análises laboratoriais. Ao IPMA reserva-se o direito de utilizar toda a informação nela contida para efeitos de publicações, relatórios da entidade financiadora e divulgação ao público em geral.

Resumo

Devido à crescente procura por produtos provenientes de aquacultura, o setor tem dedicado especial atenção à otimização das suas taxas de produção. Neste contexto, são variadas as investigações direcionadas em melhorar o rendimento da produção das principais espécies produzidas em aquacultura, de forma a suprir a procura global. O crescimento dos organismos produzidos é uma das características economicamente mais relevantes deste setor, mas é também um processo complexo, dependente de vários fatores. Alguns estudos demonstraram que as interações entre o microbioma intestinal e o hospedeiro são cruciais na mediação do desenvolvimento, homeostasia e funcionalidade do indivíduo. A sua relevância levou a investigação no domínio da aquacultura a examinar e manipular as suas características, visando melhorar o bem-estar animal e o crescimento, permitindo que a indústria se torne mais eficiente e lucrativa. Embora tenham sido realizados numerosos estudos sobre este tema no ser humano e noutros vertebrados superiores, poucos estudos relacionaram o efeito do microbioma intestinal no crescimento dos peixes. Até à data, foram fornecidas informações pouco conclusivas sobre as suas características e como afetam o desenvolvimento individual. Para fornecer dados que possam ajudar a compreender o papel do microbioma intestinal na melhoria do crescimento, é necessário compreender as características inerentes do mesmo em teleósteos e estabelecer pontos de referência sobre a sua composição, para desenvolver ferramentas de seleção mais eficazes na produção aquícola. A microbiota intestinal sofre alterações ao longo do ciclo de vida da dourada (*Sparus aurata*). Este estudo identifica e compara a população bacteriana do microbioma intestinal em juvenis desta espécie. O objetivo é identificar as principais diferenças no microbioma entre os dois perfis de crescimento distintos. A microbiota intestinal da dourada correspondente ao perfil de crescimento rápido (FG) e crescimento lento (SG), foi analisada por meio de procedimentos padrão de isolamento e caracterizada em combinação com a análise da sequência do gene 16S rRNA. As principais diferenças e semelhanças qualitativas, pertinentes ao microbioma intestinal entre os perfis de crescimento foram identificadas, assim como a abundância das populações bacterianas no epitélio intestinal, fornecendo resultados que apoiam a evidência científica de que existem padrões bacterianos associados a diferentes perfis de crescimento.

Palavras-chave: aquacultura, dourada, crescimento, microbioma intestinal

Abstract

Due to the growing demand for aquaculture products, the sector has devoted special attention to optimizing its production rates. In this context, various research efforts have been directed towards improving the production yield of the main species produced in aquaculture to meet global demand. The growth of farmed organisms is one of the most economically significant characteristics of this sector, yet it is also a complex process, dependent on several factors. Some studies have demonstrated that the interactions between the intestinal microbiome and the host are crucial in mediating development, homeostasis, and individual functionality. Its relevance has led aquaculture research to examine and manipulate its characteristics, aiming to improve animal welfare and growth, thereby allowing the industry to become more efficient and profitable. Although numerous studies have been conducted on this topic in humans and other higher vertebrates, few have explored the effect of the intestinal microbiome on fish growth. To date, little conclusive information has been provided regarding its characteristics and how they affect individual development. To provide data that may help understand the role of the intestinal microbiome in enhancing growth, it is necessary to comprehend its inherent characteristics in teleost fish and establish reference points for its composition, to develop more effective selection tools in aquaculture production. The intestinal microbiota undergoes changes throughout the life cycle of gilthead seabream (*Sparus aurata*). This study identifies and compares the bacterial population of the intestinal microbiome in juveniles of this species. The goal is to identify the main differences in the microbiome between two distinct growth profiles. The intestinal microbiota of gilthead seabream corresponding to the fast growth (FG) and slow growth (SG) profiles was analyzed using standard isolation procedures and characterized in combination with 16S rRNA gene sequence analysis. The main qualitative differences and similarities relevant to the intestinal microbiome between the growth profiles were identified, as well as the abundance of bacterial populations in the intestinal epithelium, providing results that support scientific evidence of bacterial patterns associated with different growth profiles.

Keywords: aquaculture, sea bream, growth, gut microbiome

Lista de Abreviaturas

AGCCs - Ácidos gordos de cadeia curta

ASVs - Amplicon Sequence Variants

DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

EPPO - Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FG - Perfil de crescimento rápido

FISH - Hibridação *in situ* por fluorescência

IMTA - Sistema Multi-trófico Integrado semi-intensivo em tanques de terra

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LPS - Lipopolissacáridos

NGS - Next Generation Sequencing

OTUs - Operacional Taxonomic Units

Pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

QC - Controle de qualidade

RGR - Relative Growth Rate (Taxa de crescimento Relativa)

rRNA - Ribosomal RNA

SG - Perfil de Crescimento Lento

SGR - Specific Growth Rate (Taxa de crescimento específica)

SRA - Sequence Read Archive

T - Etapa experimental

TGI - Trato Gastrointestinal

TJ - Junções intestinais apertadas

Índice Geral

Índice de Gráficos	10
Índice de Figuras	12
Descrição da Casuística de Estágio	13
I Introdução	15
1. A produção em Aquacultura	15
2. Dourada	17
3. Microbioma.....	18
3.1 Microbioma do trato digestivo.....	19
3.2 Propriedades funcionais do microbioma.....	21
3.3 Ferramentas de análise ou analíticas.....	23
II Materiais e métodos.....	26
1. Material biológico e características do estudo	26
2. Desenho experimental.....	27
3. Dieta.....	30
4. Amostragem.....	30
5. Métodos Analíticos	30
5.1 Análise do desempenho de crescimento	30
5.2 Amostragem do conteúdo gastrointestinal.....	31
5.3 Extração de DNA.....	31
5.4 Sequenciação 16S da comunidade bacteriana intestinal	31
5.5 Construção da biblioteca, controlo de qualidade e sequenciação	33
5.6 Etapas de processamento de análise bioinformática	34
5.7 Análise de OTU/ASVs e anotação taxonómica	34
6. Análise estatística	35
7. Disponibilidade dos dados.....	35
8. Declaração de ética.....	35

III Resultados.....	36
1. Crescimento	36
2. Microbioma.....	37
IV Discussão.....	52
V Conclusão	67
VI Referências bibliográficas.....	68

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das atividades gerais realizadas durante o período de estágio14

Gráfico 2 - Distribuição das atividades relacionadas com o estudo durante o período de estágio14

Gráfico 3 - Desempenho de crescimento entre peixes com perfil de crescimento rápido (FG) e peixes com perfil de crescimento lento (SG). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ 36

Gráfico 4 - Diagrama de Venn. Representa as Variantes de Sequência de Amplicons (ASVs), comuns e únicas, observadas na comunidade bacteriana intestinal de juvenis de dourada (*Sparus aurata*), entre os perfis de crescimento: rápido (FG) e lento (SG). cada círculo representa um grupo. Os valores em partes sobrepostas representam sequências de características comuns. Os outros são sequências de características específicas de cada grupo. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene. 37

Gráfico 5 (a) e (b) - Distribuição da abundância relativa dos 10 principais filos na microbiota intestinal de juvenis de dourada (*Sparus aurata*), em cada perfil de crescimento analisado, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG). Reproduzido com permissão da empresa NovoGene (a) 39 e 39

Gráfico 6 - Para analisar a relação filogenética da categoria taxonômica gênero, foram selecionados os 100 principais gêneros comuns entre os grupos analisados e a árvore evolutiva foi desenhada usando as sequências representativas alinhadas. Diferentes cores dos ramos representam diferentes filos. A abundância relativa de cada gênero em cada grupo foi exibida. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene 41

Gráfico 7 - De acordo com as informações de abundância relativa dos 35 principais gêneros comuns entre os grupos analisados, foi elaborado um mapa de calor para verificar se as amostras dos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), estão agrupadas. O mapa de calor permite observar as semelhanças e diferenças entre os dois grupos. A coloração no mapa de calor indica a distância entre a pontuação bruta e a média, medida pelo valor absoluto de «z». Um valor de «z» negativo indica que a pontuação bruta

está abaixo da média, enquanto um valor de «z» positivo indica que está acima da média. Esta representação gráfica facilita a visualização das variações na abundância relativa da categoria taxonómica género, entre os diferentes perfis de crescimento, permitindo uma análise comparativa precisa e eficiente. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene

..... 44

Gráfico 8 - Distribuição da abundância relativa dos principais géneros taxonómicos comuns entre dos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG) com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal45

Gráfico 9 - Distribuição da abundância relativa dos principais géneros taxonómicos comuns entre os dos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), com mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal 46

Gráfico 10 - Abundância relativa das 35 espécies predominantes comuns entre os grupos analisados. Com o propósito de avaliar a possível agregação das amostras nos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), bem como de identificar as semelhanças e diferenças entre os perfis de crescimento, foi elaborado um mapa de calor. O valor absoluto de «z» foi utilizado para quantificar a distância entre a pontuação bruta e a média do desvio padrão. Um valor de «z» negativo indica que a pontuação bruta está abaixo da média, enquanto um valor positivo sugere o contrário. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene 49

Gráfico 11 - Distribuição da abundância relativa das principais espécies taxonómicas comuns entre os perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal50

Gráfico 12 - Distribuição da abundância relativa das principais espécies taxonómicas comuns entre os perfis "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG) com mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal. 51

Índice de Figuras

Figura 1 - Espécie em estudo, dourada (<i>Sparus aurata</i>), proveniente da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO). Original do autor.....	18
Figura 2 - Fluxograma dos fatores envolvidos na modulação do microbioma intestinal em teleósteos. Original do autor.....	23
Figura 3 - Fluxograma do desenho experimental. Original do autor.	29
Figura 4 - Sequência de operações de limpeza e controlo de qualidade das amostras para a análise bioinformática. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.	32
Figura 5 - Metodologia experimental para a preparação da biblioteca de DNA. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.	33

Descrição da Casuística de estágio

O contexto deste estágio curricular, autorizado pelo Doutor Pedro Pousão-Ferreira, investigador responsável pela Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), pertencente ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), e decorreu entre 10 de outubro de 2022 a 31 de março de 2023. Durante este período, foi concedida a responsabilidade de executar diversas atividades essenciais para a manutenção e operação regular da estação, bem como para a execução do estudo inerente a esta dissertação. No início do estágio, o autor foi apresentado às diferentes instalações e às normas operacionais que regem as atividades da EPPO, garantindo o seu funcionamento adequado.

Participou em diversas formações realizadas nas instalações do IPMA. Entre estas, destaco o curso "Sistema Multi-trófico" Integrado semi-intensivo em tanques de terra (IMTA)", facultado pelo projeto AQUA&AMBI, que contribuiu significativamente para o enriquecimento de conhecimentos adquiridos. A maior parte do tempo foi dedicada ao estudo sugerido pelos orientadores, em que o foco principal das atividades realizadas, permitiu aprofundar o conhecimento sobre os fatores que modulam o microbioma intestinal em peixes, assim como a sua associação com o desenvolvimento dos mesmos, devido à sua importância e relevância na investigação em aquacultura.

De entre as atividades inerentes ao estudo neste local, compreendem-se: amostragens biométricas, manejo das condições experimentais, registos diários de alimento fornecido, registos da saturação de oxigénio na água, registos de temperatura e de mortalidade. Em relação à componente laboratorial que diz respeito a este estudo, foi realizada pelo autor toda a extração de DNA referente às 60 amostras analisadas, assim como a leitura da absorvância de cada amostra. Com base na literatura científica e no conhecimento adquirido ao longo do curso em Medicina veterinária, foram estudadas e discriminadas as diferentes níveis taxonómicos, os mecanismos funcionais de todos os microrganismos bacterianos de interesse, responsáveis por provocar ação benéfica e/ou patogénica no microbioma intestinal (10 filos / 100 géneros / 35 espécies).

Foram compreendidas as ferramentas e métodos necessários para avaliação e identificação das comunidades bacterianas presentes no microbioma intestinal, cuja análise bioinformática e sequenciação genética foi executada pela empresa contratada, NovoGene. Ainda durante o período de estágio curricular, foi possível ao autor estar envolvido noutros departamentos integrados nesta instituição. Entre estes, o laboratório de patologia, que providenciou conhecimentos à cerca da patofisiologia, planeamento profilático e terapêutico

sobre os principais microrganismos aqui estudados, como por exemplo o *Amyloodinium*. Na cadeia de alimentação, foram retidos conhecimentos relacionados com as necessidades nutricionais requeridas pelas espécies aqui produzidas, tendo em conta o seu desenvolvimento, desde a fase larvar até à maturidade.

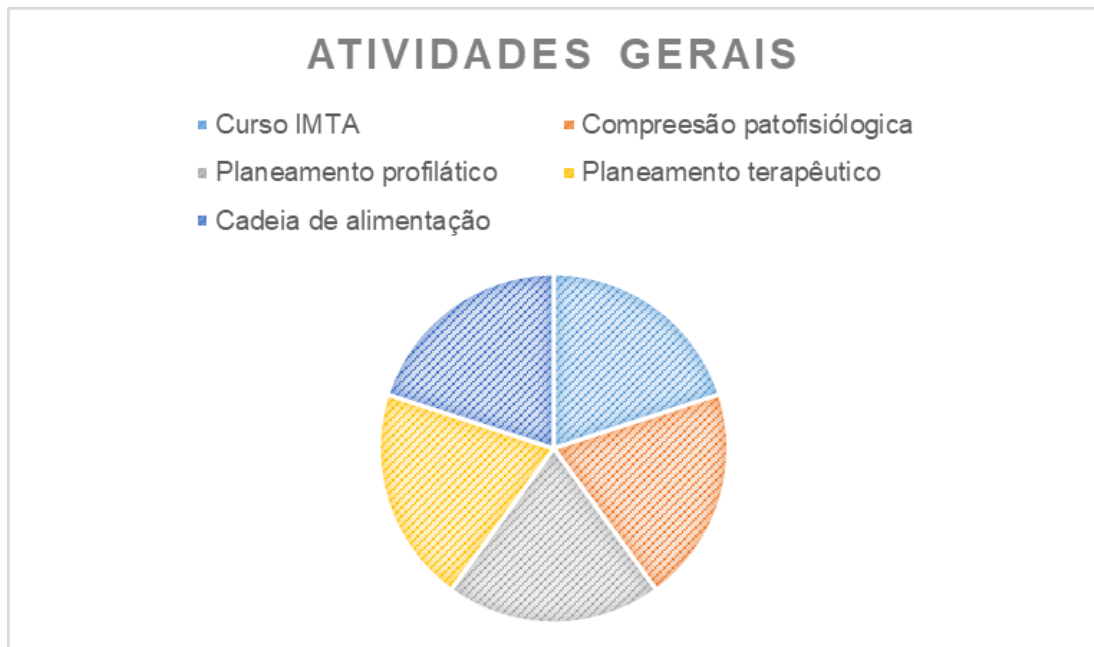


Gráfico 1. Distribuição das atividades gerais realizadas durante o período de estágio.



Gráfico 2. Distribuição das atividades relacionadas com o estudo durante o período de estágio.

I Introdução

1. A produção em Aquacultura

A produção proveniente da aquacultura, da exploração de pescado selvagem e as importações e exportações que delas derivam, determinam a distribuição de alimentos de origem aquática às populações (Jennings et al., 2016). Face ao aumento da procura e consumo de peixe, que acarretam problemas como a sobre-exploração e a estagnação da pesca, principalmente pela redução exponencial dos stocks de pescado selvagem (Piazzon et al., 2019), o abastecimento sustentável de alimentos é cada vez mais reconhecido como uma das questões ambientais mais desafiantes (Henriksson et al., 2021). Surgem agora novos desafios como a manutenção da segurança alimentar, alcançada quando o abastecimento alimentar é suficiente, seguro e sustentável, de forma a proporcionar benefícios nutricionais e apresentar riscos mínimos para a saúde, visando fornecer alimentos não só agora mas também para as gerações futuras (Jennings et al., 2016).

A produção de animais e plantas aquáticas, tem registado um crescimento exponencial nos últimos anos. Em 2020 a produção aquícola mundial atingiu um recorde de 122,6 milhões de toneladas, incluindo 87,5 milhões de toneladas de animais aquáticos no valor de 264,8 mil milhões de dólares e 35,1 milhões de toneladas de algas no valor de 16,5 mil milhões de dólares. É evidente o contínuo crescimento da aquacultura, segundo os dados mais recentes (FAO, 2022) este setor contribuiu com 49% da produção total de animais aquáticos (88 milhões de toneladas), comparativamente à contribuição de 51% proveniente da pesca de captura (90 milhões de toneladas).

Embora a produção do sector da pesca de captura tenha atingido um patamar com muitas unidades populacionais totalmente exploradas ou sobre exploradas, o crescimento contínuo do sector da aquacultura será necessário para satisfazer a crescente procura mundial de alimentos. Neste contexto, a investigação em aquacultura surge como ferramenta essencial da crescente compreensão sobre dados que possam ser úteis à segurança alimentar, à qualidade nutricional e a um maior conhecimento sobre o desenvolvimento e potencialização de um crescimento mais rápido, para o abastecimento alimentar mundial (Piazzon et al., 2019).

Apesar da maioria dos sistemas de aquacultura sofrerem de grandes lacunas a nível do seu desempenho, são cada vez mais as intervenções e investimentos direcionados a aumentar significativamente a produção deste setor (Henriksson et al., 2021). Para reduzir os custos de produção, são frequentemente implementados métodos intensivos, em que os peixes são mantidos em altas densidades e alimentados com dietas formuladas. Estas

práticas têm apresentado uma série de problemas, incluindo o aumento da incidência de doenças, levando a um crescimento deficiente, baixa produtividade e custos elevados em tratamento (Lafferty et al., 2015).

Ultrapassar estas barreiras é fundamental para estabelecer um crescimento sustentável neste setor, que assenta atualmente na manipulação de parâmetros como a dieta, as condições ambientais e as características genéticas, para melhorar o rendimento da sua produção. Durante a última década, a produção proveniente de aquacultura tem sido cada vez mais reconhecida pela sua contribuição fundamental em satisfazer a procura de alimentos para a população mundial, que atingirá cerca de 10 mil milhões de pessoas em 2050. Além dos requisitos de segurança alimentar e qualidade nutricional exigidos, potenciar e uniformizar o desenvolvimento das principais espécies produzidas em aquacultura, como a dourada (*Sparus aurata*), tem sido fundamental para o crescimento desta indústria (FAO, 2022).

O crescimento dos peixes é um processo multifacetado que está diretamente associado à sua genética, à qualidade e disponibilidade dos alimentos assim como às condições ambientais circundantes (Hamre et al., 2014). Na produção de dourada, existem frequentemente diferenças significativas de crescimento entre indivíduos no mesmo lote de produção, sob as mesmas condições de manejo. Stephens et al., (2016) descrevem que as associações resultantes entre os animais e os microrganismos que os colonizam, têm um impacto profundo na maturação dos seus tecidos e na função dos órgãos na fase adulta. Em particular, o desenvolvimento do trato digestivo dos vertebrados, que alberga a grande maioria do microbioma do organismo, é em grande parte influenciado pela presença e composição do microbioma intestinal (Bates et al., 2006; Semova et al., 2012).

Devido à atual recessão económica e à flutuação do mercado da dourada, a otimização da sua produção em aquacultura e a redução dos custos inerentes, surgem como necessidade para melhorar a rentabilidade da sua exploração (Parma et al., 2016). Recentemente surgiram novas perspetivas que visam potenciar o desenvolvimento animal e consequentemente a produtividade dos sistemas de aquacultura. A relevância do conhecimento acerca das funções em que o microbioma pode intervir no ser humano (desenvolvimento do indivíduo, imunidade, nutrição), foi determinante para impulsionar a sua investigação no domínio da produção animal, nomeadamente em aquacultura (Furusawa et al., 2013). Ao longo dos últimos anos aumentaram o número de investigações que se tem dedicado a estudar o microbioma intestinal dos animais, proporcionando uma nova compreensão biológica das funções do intestino e dos microrganismos que nele residem (Jandhyala et al., 2015; Sekirov et al., 2010).

Hoje, sabe-se que o microbioma intestinal dos teleósteos (peixes ósseos), tal como noutros vertebrados, desempenha um papel determinante na homeostasia e no

desenvolvimento do hospedeiro, sendo influenciado por alguns fatores endógenos e exógenos que podem intervir na composição do mesmo (Dehler et al., 2017; J. Li et al., 2014; Piazzon et al., 2019; Rawls et al., 2004; Stephens et al., 2016). Para que haja a inclusão dos conhecimentos adquiridos sobre o microbioma dos peixes na sua produção em aquacultura, a sua compreensão deve basear-se nas interações entre as comunidades de microrganismos e o hospedeiro, nos seus genomas e nas condições ambientais que os envolvem (Marchesi & Ravel, 2015).

2. Dourada

Conhecida pela comunidade científica de investigação em aquacultura, a dourada é uma espécie do género *Sparus* que deu o nome a toda a família dos *Sparídeos*. Pertence à superclasse dos peixes de barbatanas raiadas, *Actinopterygii*, à classe dos *Osteichthyes* e à ordem dos *Perciformes* (Yúfera et al., 2011). É das principais espécies de maior interesse económico na bacia mediterrânica e a terceira espécie de maior relevância a ser produzida na Europa (Mongile et al., 2014; Piazzon et al., 2019). Atualmente, a dourada pode ser cultivada de forma extensiva, semi-intensiva ou intensiva, cada uma caracterizada por níveis crescentes de controlo humano sobre o sistema de cultivo.

Os *Sparidae* são uma família cosmopolita e os peixes esparídeos podem ser encontrados e reproduzidos em mares temperados e tropicais por todo o mundo, a maioria dos membros desta família são hermafroditas sequenciais ou protândricos, como a dourada. Este peixe é um hermafrodita protândrico sequencial, desenvolve-se primeiro como macho e nos ciclos seguintes (dependendo de fatores ambientais, crescimento e dieta) pode alterar o seu morfismo sexual através do desenvolvimento dos seus órgãos sexuais. Os peixes desta família têm uma época de desova longa, que varia entre 60 e 150 dias, e desovam diariamente ou de forma muito cíclica (Dimitroglou et al., 2011; Mylonas et al., 2011).



Figura 1. Espécie em estudo, dourada (*Sparus aurata*), proveniente da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO). Original do autor.

3. Microbioma

Apesar do conhecimento adquirido acerca da relação entre o Homem e os microrganismos que o colonizam, e embora compreendida em muitos sistemas de vertebrados, até à data, a nossa compreensão da comunidade bacteriana intestinal em teleósteos e do seu significado funcional está muito aquém do necessário (Llewellyn et al., 2016). É importante que os estudos sobre este tema forneçam uma base com evidência científica, pois a sua compreensão é cada vez mais necessária para identificar fenótipos favoráveis e disbióticos (ou patogénicos), para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manipulação das comunidades microbianas do trato gastrointestinal, de forma a promover e maximizar o estado de saúde do hospedeiro, otimizando o seu crescimento (Legrand et al., 2018; Romero et al., 2014).

Os microrganismos são a forma de vida predominante que habita o planeta, mas apesar da sua diversidade, continuam a ser dos organismos menos caracterizados, com potencialmente mais de 99% ainda por se descobrir (Locey & Lennon, 2016; Z. Zhou, 2003). Embora as bactérias sejam ubíquas em todos os

habitats terrestres que sustentam a vida, é observada uma diversidade significativa das comunidades bacterianas em diferentes tipos de ambientes (Sullam et al., 2012). Os peixes tiveram origem há mais de 600 milhões de anos e incluem quase metade de todos os vertebrados existentes (Nelson, 2006), tal como o Homem, adquiriram meios para se desenvolver e subsistirem, com recurso a interações dinâmicas com os microrganismos que residem nos seus tecidos, durante todo o seu ciclo de vida (Rawls et al., 2004). A relação complexa entre o hospedeiro e a comunidade de microrganismos que habitam diferentes epitélios do seu organismo, em que as superfícies e cavidades interagem com o ambiente, é denominada de microbioma.

3.1 Microbioma do trato digestivo

Particularmente, a colonização do intestino em animais não-mamíferos, como os peixes, começa na fase larvar, aquando a abertura da boca (Cicala et al., 2020; Grisez et al., 1997). Atualmente reconhece-se que as bactérias pioneiras na sua colonização são específicas para cada espécie, determinadas principalmente pela forma como as suas glicoproteínas se ligam à superfície do ovo e pela diversidade das comunidades microbiológicas presentes no ambiente circundante. As bactérias associadas ao córion, que as larvas estéreis integram ao eclodirem, são as primeiras a colonizar o trato gastrointestinal (TGI) em desenvolvimento (A. M. . Larsen, 2014). Desta forma, os microrganismos do córion, da água e do alimento interagem com o epitélio intestinal, que se encontra intimamente ligado à absorção de nutrientes e influencia uma vasta gama de processos biológicos do hospedeiro (Sundh & Sundell, 2015).

Os peixes incorporam no seu organismo comunidades microbianas provenientes do ambiente circundante, ao longo de todo o ciclo de vida, que se diferenciam entre a microbiota residente (autóctone), que coloniza a superfície da mucosa do trato digestivo, e a microbiota transitória (alóctone) associada à digesta (Lowrey et al., 2015; Ringø et al., 2016). A microbiota autóctone está mais associada ao tecido epitelial, onde se torna intimamente ligada às células do hospedeiro, sendo em grande parte influenciada pelo genótipo do mesmo (Banerjee & Ray, 2017; Kim et al., 2007; Rawls et al., 2006; Roeselers et al., 2011).

Assim, o conceito de microbioma intestinal consiste num constante equilíbrio de relações simbióticas, que reúnem especialização metabólica e complementaridade, onde se incluem todas as interações estabelecidas entre hospedeiro, o TGI, os microrganismos presentes e toda a informação genética correspondente. Estas funções especializadas contribuem para o desempenho da absorção nutricional, para

o desempenho imunológico de proteção contra agentes patogênicos entre outras funções fisiológicas como o desenvolvimento adequado e sobrevivência dos indivíduos (Merrifield & Rodiles, 2015).

As bactérias representam o grupo predominante da microbiota intestinal dos peixes, prosperam no epitélio da mucosa, estimando-se que os peixes possam albergar até 10^{11} bactérias por cada grama de conteúdo intestinal. De entre os colonizadores mais prevalentes incluem-se bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias (Llewellyn et al., 2014; Nayak, 2010). Os principais agentes bacterianos representados na microbiota dos peixes pertencem aos filos *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidota* e *Actinobacteria*, sendo mais representativos os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidota* que constituem frequentemente até 90% da microbiota intestinal (Ghanbari et al., 2015; Ingerslev et al., 2014; H. Liu et al., 2016).

A adaptação recorrente por parte do peixe, é exigida face às alterações da composição bacteriana que ocorrem ao longo de todo o seu ciclo de vida. O microbioma intestinal é influenciado por diversos fatores, compreendidos em três categorias principais: a dieta, as características ambientais e o próprio hospedeiro. Deste modo, fatores como as preferências alimentares, o habitat (localização geográfica), o estado de cativeiro, o stress ambiental, o uso de antibióticos ou outros fármacos recorrentes em aquacultura, a sazonalidade, a salinidade, a temperatura, a oxigenação, o pH entre outros parâmetros físico-químicos da água, são cruciais para a saúde dos peixes e podem desencadear desequilíbrios no microbioma, afetando o desenvolvimento do indivíduo (Egerton et al., 2018; Piazzon et al., 2019; Sullam et al., 2012).

Foi demonstrado que o microbioma pode ser potencialmente moldado por fatores específicos relacionados com o hospedeiro, tais como, a filogenia, o sexo, a idade, a fase de desenvolvimento, o nível trófico e o genótipo (Givens et al., 2015; A. M. Larsen et al., 2014; J. Li et al., 2014; X. Li et al., 2017; Miyake et al., 2015; Navarrete et al., 2012; C. C. R. Smith et al., 2015; Star et al., 2013), que influenciam a composição microbiana e desempenham um papel na pressão seletiva que determina quais as bactérias que habitam as diferentes regiões do intestino. No intestino dos peixes, as bactérias podem desempenhar um papel fundamental na digestão dos alimentos, produzir aminoácidos, fornecer nutrientes e apoiar a imunomodulação, por exemplo, através da secreção de compostos que ajudam a evitar a colonização de agentes

patogénicos. No entanto, o seu papel exato e a extensão dos seus benefícios são em grande parte indefinidos (Austin, 2006; Nayak, 2010).

Apesar das lacunas ainda por preencher no conhecimento científico, sabe-se que o microbioma presente em todo o organismo, nomeadamente nos sistemas gastrointestinais de peixes teleósteos, desempenha não apenas um papel na digestão, mas também exerce uma influência significativa nos processos de nutrição, crescimento, reprodução, no sistema imunológico e na suscetibilidade do hospedeiro a doenças (Romero et al., 2014). As bactérias patogénicas ou disbióticas também podem ser detetadas no microbioma intestinal e juntamente com as bactérias não patogénicas, são úteis para compreender o estado de saúde e de desenvolvimento dos peixes, bem como da qualidade das condições ambientais que os envolvem (Merrifield & Rodiles, 2015).

3.2 Propriedades funcionais da microbiota intestinal em peixes

Nos últimos anos, foram efetuadas várias investigações para explorar a composição bacteriana no microbioma dos peixes com diferentes hábitos alimentares, tais como herbívoros, carnívoros e omnívoros. O hospedeiro e os simbioses intestinais têm uma associação estreita, na qual os simbioses melhoram a imunidade e a função fisiológica do hospedeiro. Esta relação, que pode ser mutualista, comensalista ou parasitária, é conhecida como simbiose (Lowrey et al., 2015). As bactérias autóctones aderentes à mucosa têm um impacto no metabolismo e na absorção de nutrientes no intestino, desempenhando papéis fisiologicamente importantes, que influenciam processos metabólicos como a digestão de hidratos de carbono complexos, de proteínas e a regulação do armazenamento de gordura (Bäckhed et al., 2004; Oliva-Teles, 2012; Turnbaugh et al., 2006).

A utilização de hidratos de carbono varia entre diferentes espécies de peixes: omnívoros e herbívoros toleram níveis mais elevados de hidratos de carbono na dieta em comparação com os carnívoros. Em muitas espécies de peixes marinhos, que são predominantemente carnívoras, como a dourada, é fundamental a ação das enzimas responsáveis pela digestão essencialmente de proteínas, no desempenho dos processos digestivo e de absorção (Oliva-Teles, 2012). Na produção em aquacultura, espécies como a dourada são frequentemente alimentadas com dietas à base de farinha de peixe e de alguns componentes vegetais. Para que o processo digestivo não careça de aporte nutricional ao hospedeiro, é fundamental a ação dos microrganismos intestinais produtores de enzimas digestivas como lipases, amilases, proteases e celulasas (S. Liu et al., 2020; Niu et al., 2019), que geram metabolitos

benéficos, entre estes, aminoácidos, ácidos gordos insaturados, ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs) e vitaminas, que permitem a utilização de diversos componentes dietéticos, especialmente aqueles que seriam indigestos (Hao & Lee, 2004).

A capacidade probiótica de metabolitos como AGCCs demonstra ter vários efeitos benéficos na saúde animal, entre os quais: melhorar a obtenção de energia por parte do hospedeiro, qualidades anti-inflamatórias, fortalecimento da barreira epitelial e resistência a doenças (Piazzon et al., 2017). Como principais AGCCs com propriedades que impulsionam a biodisponibilidade nutricional, destaca-se o propionato, o acetato, o lactato e especialmente o butirato, que é rapidamente absorvido pelos enterócitos, onde reforça a barreira intestinal através da modulação das proteínas da junção estreita e atua como fonte de energia (Donohoe et al., 2011; Peng et al., 2009). Além disso, a suplementação com probióticos na dieta pode alongar e alargar as vilosidades intestinais, bem como as microvilosidades de peixes em desenvolvimento, como os juvenis (S. Liu et al., 2020; Niu et al., 2019). Adicionalmente, a integridade da barreira intestinal é progressivamente melhorada durante o desenvolvimento intestinal, com auxílio das junções apertadas intestinais (TJ) e da produção muco.

Algumas bactérias apresentam patogenicidade e são capazes de danificar o epitélio intestinal (Salinas et al., 2008). A integridade intestinal danificada, causada pelo desequilíbrio da simbiose entre o hospedeiro, o intestino e a infecção por agentes patogénicos, pode prejudicar o desenvolvimento dos peixes. Por outro lado, os efeitos negativos causados pelas fontes de proteínas de origem vegetal, nomeadamente a resposta inflamatória intestinal intensa, que pode destruir o epitélio intestinal, resulta num desenvolvimento intestinal deficiente. Consequentemente, muitos estudos têm-se centrado na exploração de aditivos funcionais, como a suplementação dietética com alguns microrganismos inoculados, que contrariem estes efeitos adversos e moldem positivamente o microbioma (Bakke-McKellep et al., 2007; Y. Liu et al., 2018).

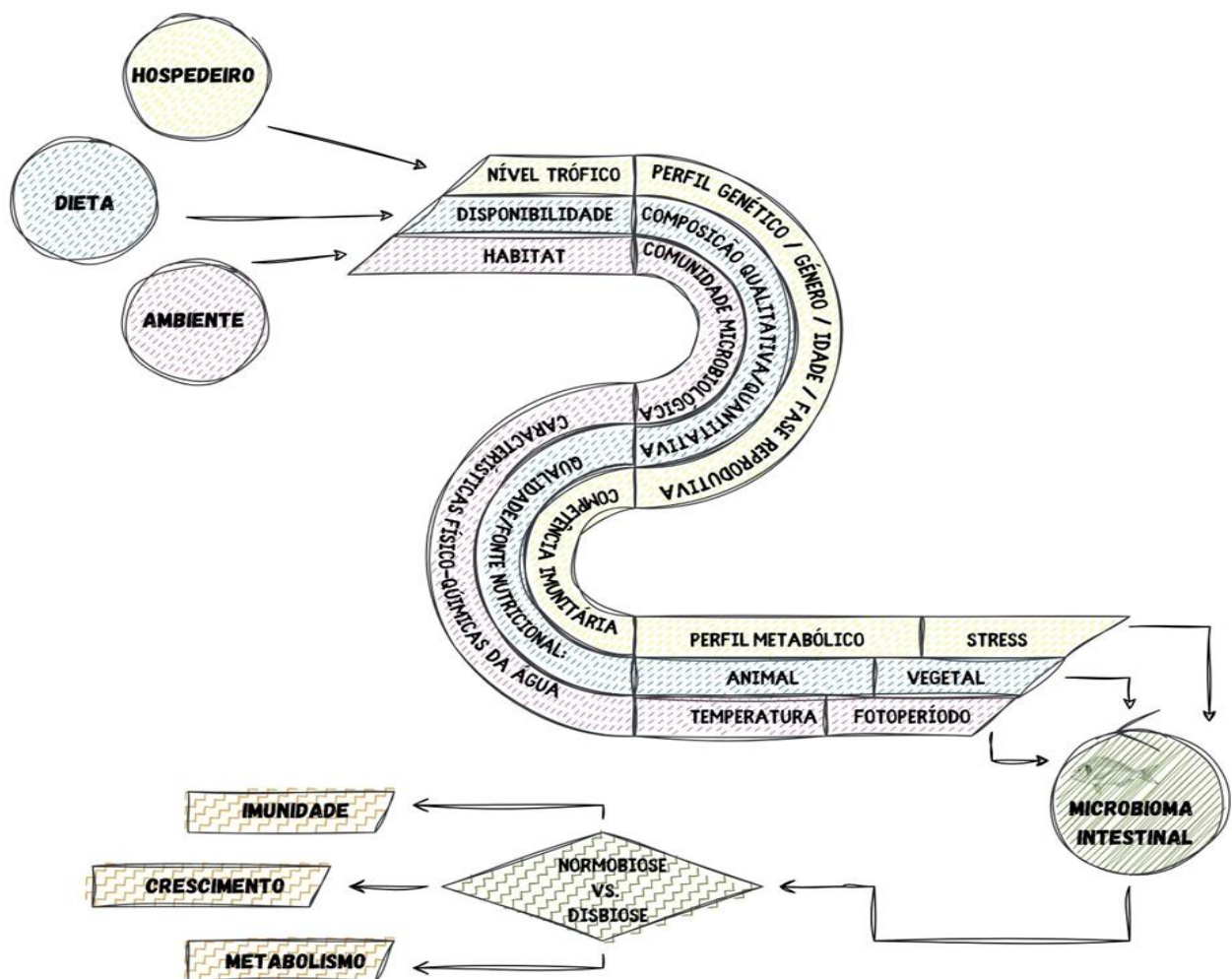


Figura 2. Fluxograma dos fatores envolvidos na modulação do microbioma intestinal em teleósteos. Original do autor.

3.3 Ferramentas de análise ou analíticas

Atualmente, o microbioma intestinal é reconhecido como um "órgão adicional", por intervir no desenvolvimento, na homeostasia, na supressão de agentes patogênicos, entre outras características fisiologicamente cruciais de todos os vertebrados (Dhanasiri et al., 2011). Apesar do recente interesse inerente às potencialidades da investigação sobre o microbioma intestinal dos peixes, os primeiros esforços para compreender algumas das suas características remontam à primeira metade do século XX, publicados a partir do final da década de 1920 (GIBBONS, 1933; REED & SPENCE, 1929). Até esta década a abordagem geral era baseada na

utilização de métodos convencionais dependentes de cultura (Ringø & Gatesoupe, 1998), no entanto, em todos os estudos apresentados foi descrita uma representação bastante restrita das comunidades microbianas do trato gastrointestinal dos peixes, tendo sido relatada de baixa cultivabilidade (Schulze et al., 2006).

Estes métodos convencionais consomem muito tempo e não são exatos quanto à identificação dos microrganismos isolados (Spanggaard et al., 2000). Diversos estudos concluíram que as técnicas dependentes de cultura possuem uma sensibilidade duvidosa e que apenas permitem identificar uma fração limitada das comunidades presentes (Lan & Love, 2012; A. Larsen et al., 2013). Mais recentemente, foram aplicados métodos independentes de cultura ao estudo das comunidades microbianas que colonizam o trato gastrointestinal, o que permitiu uma melhor compreensão do microbioma dos peixes, fornecendo resultados mais rápidos e novos conhecimentos de alta resolução sobre a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas, substituindo as técnicas dependentes de cultura, utilizadas até então para identificar os microrganismos presentes no intestino ou noutros tecidos (Ghanbari et al., 2015).

Diferentes estratégias são comuns na caracterização de comunidades microbianas através de métodos independentes de cultura, como a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), dirigida a regiões específicas do RNA ribossômico (rRNA) (Del'Duca et al., 2013). Outras técnicas também têm sido empregues para comparar a diversidade bacteriana em comunidades que colonizam o trato gastrointestinal dos peixes, como o método de impressão digital de DNA (Fjellheim et al., 2012; A. M. Larsen et al., 2015). Estas metodologias destacam-se pela sua celeridade, custo moderado e capacidade para análises de média a elevada escala. Contudo, importa sublinhar que, em grande parte, os resultados obtidos por estes métodos são predominantemente qualitativos, proporcionando percepções acerca da complexidade das comunidades mais destacadas, sem, contudo, detalhar os membros compreendidos a diferentes níveis taxonómicos (Z. Zhou et al., 2009).

Para se obter uma visão abrangente e independente da diversidade numa amostra, recorre-se à sequenciação do gene bacteriano 16S rRNA. Esta técnica tornou-se uma ferramenta precisa e rotineira na identificação bacteriana (Rosselló-Mora, 2005). Inicialmente, foram criadas bibliotecas de clones 16S, seguidas pela sequenciação individual destes clones (Clements et al., 2007; S. Wu et al., 2010), embora seja muito exata em termos de qualidade da sequência, a sequenciação de centenas de clones individuais é dispendiosa e demorada, limitando a aplicabilidade

deste método. Atualmente opta-se pela transição da metodologia baseada em Sanger para as tecnologias emergentes de DNA, especificamente, a sequenciação de nova geração (NGS). Esta transição possibilita, atualmente, a obtenção de conjuntos de dados metagenômicos abrangentes, com uma redução nos custos por megabase de sequência de DNA (Mardis, 2011).

O avanço nas técnicas de meta sequenciação microbiana sem cultura significa que as comunidades bacterianas podem ser caracterizadas em pormenor sem precedentes (Llewellyn et al., 2016). A sequenciação NGS, com base em genomas representativos e genes característicos, como o 16S (rRNA), tem impulsionado uma variedade de estudos destinados a caracterizar minuciosamente as comunidades presentes em diversos ambientes, com uma abordagem mais rigorosa e precisa (Bolnick et al., 2014; A. M. . Larsen, 2014). No entanto, as análises de gene 16S rRNA só podem avaliar a composição filogenética de uma amostra e não fornecem informações diretas sobre suas capacidades funcionais. A análise metagenômica em larga escala pode aumentar o conteúdo informativo da amostra gerada, não apenas, determinando a abundância relativa de todos os genes, mas também fornece uma descrição do potencial funcional de cada comunidade. Comparada aos métodos baseados em genes característicos, esta técnica oferece uma descrição mais abrangente do que as pesquisas filogenéticas (Vaishampayan et al., 2010).

Os avanços na tecnologia de sequenciação colocaram-na na vanguarda da investigação, remodelando a abordagem das questões inerentes ao genoma. Em consequência, o papel crucial da bioinformática contribui especialmente para a análise e interpretação de dados. Estas capacidades avançadas de sequenciação não só inspiraram novas áreas de investigação, mas também resolveram questões cruciais sobre a regulação e variabilidade genómica, introduzindo práticas inovadoras na investigação (Mardis, 2011). Desde o aparecimento das novas tecnologias de sequenciação, foram bastantes os estudos efetuados sobre o microbioma intestinal dos peixes. A nova tecnologia de sequenciação e a análise bioinformática ultrapassaram as limitações das tecnologias anteriores e tornaram mais simples o estudo exaustivo do microbioma de várias espécies produzidas em aquacultura (Austin, 2006; van Kessel et al., 2011).

As comunidades microbianas apresentam grandes variações intra e interespecíficas. No que se refere à compreensão estrutural e funcional do microbioma intestinal, é importante ter em conta que este também sofre variações dentro do mesmo indivíduo, em diferentes partes do intestino (Piazzon et al., 2019). Além destes,

existem outros fatores fundamentais que tem de ser equacionados aquando o delineamento do estudo, inerentes às características ambientais e nutricionais, possíveis de serem controladas. Inclusive é preciso ter em conta a técnica de extração de DNA e os métodos de avaliação das comunidades, entre os quais se destacam: pirosequenciação, sequenciação Illumina e PCR-DGGE, que têm impacto nos resultados deste tipo de estudos (Piazzon et al., 2017). Todas estas fontes de variação dificultam o estabelecimento de um microbioma de referência, o que realça a importância dos estudos realizados comunicarem todos os pormenores inerentes à sua configuração experimental.

Com base na literatura descrita, foi possível compreender que o conhecimento atual sobre a influência bacteriana que reside no trato digestivo dos peixes, no seu processo de desenvolvimento, está muito aquém do seu potencial. Além das propriedades benéficas que estes microrganismos apresentam, é preciso ter em conta os mecanismos patogénicos e qual a relação entre a sua abundância e os efeitos resultantes no hospedeiro. Neste contexto, este estudo foi delineado de forma a elucidar parte da resposta à questão “será a performance de crescimento o fator etiológico das características do microbioma intestinal ou vice-versa?”. A análise desta investigação foi comparada com as de outros estudos, de forma a ser possível compreender a relevância biofuncional dos resultados obtidos e auxiliar futuras investigações no desenvolvimento de ferramentas de seleção capazes de promover e uniformizar o crescimento e bem-estar das populações produzidas em aquacultura.

II Materiais e métodos

1. Material biológico e características do estudo

Para o presente estudo foram obtidos juvenis de dourada (*Sparus aurata*), provenientes da mesma geração, de desova natural em cativeiro. Todo o ensaio decorreu nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), pertencentes ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Portugal (37°02' N, 7°49' W). Diariamente, foram executadas as tarefas protocoladas, compreendendo medições precisas e registos sistemáticos da temperatura, saturação de oxigénio na água e quantidade de alimento fornecido. Foram realizados ajustes criteriosos no caudal de entrada da água, influenciando diretamente a taxa de renovação dos

tanques. Procedeu-se a purgas regulares, remoção dos animais mortos e, mediante uma inspeção visual detalhada, aliada ao uso de utensílios de limpeza específicos, implementaram-se os procedimentos de higiene em cada tanque, de forma protocolada. O período experimental teve a duração de 102 dias, dirigido em conformidade com as normas de sanidade e bem-estar animal. Este compromisso foi mantido desde a preparação das instalações até à execução do estudo e colheita das amostras necessárias para a obtenção dos dados, garantindo assim a integridade e validade científica do processo.

2. Desenho experimental

Os juvenis de dourada (*Sparus aurata*) foram introduzidos num tanque exterior de 18 000 litros (L), onde foram mantidos para se aclimatizarem sob condições controladas de luz, temperatura, oxigenação e alimentação até serem triados. O projeto experimental teve início (T0) com 2250 peixes, respeitando a mesma densidade de 7 kg/m³ por tanque, após terem sido transferidos e distribuídos aleatoriamente por 3 tanques de 1.500 L, com sistema de circulação aberto. O ensaio foi conduzido sob um fotoperíodo de 12 horas de luz seguidas por 12 horas de escuridão. Os peixes foram alimentados manualmente, *ad libitum*, em 4 refeições diárias, intuito de suprir os requisitos diários de saciedade. Para prevenir a perda de exemplares através do fluxo de saída, foi aplicada uma malha filtrante durante toda a duração do ensaio. A temperatura da água variou entre 22 ± 2 °C, o oxigénio dissolvido manteve-se a 7 ± 2 mg/l⁻¹, a taxa de renovação da água por tanque foi de 120%/h durante todo o ensaio, calculada para facilitar as tarefas de limpeza protocoladas assim como a remoção dos detritos produzidos, o que consequentemente garantiu a manutenção da qualidade da água durante todo o ensaio. Previamente ao estudo, efetuou-se uma amostragem biométrica a 315 peixes (105 por tanque) de forma a confirmar que a distribuição aleatória, dos indivíduos em cada tanque, respeitava a densidade estabelecida.

Em T0, foram distribuídos 750 peixes aleatoriamente por 3 tanques, em que apenas os peixes com peso médio (14g e desvio padrão de ± 1,8 g) foram selecionados. Durante o ensaio os peixes foram desdobrados 3 vezes. O primeiro desdobramento (T1), da população presente em cada tanque (L1, L2 e L3), ocorreu assim que a média do peso em todos os tanques tenha triplicado em relação ao valor

inicial, ou seja 25 dias após o início experimental. Esta componente do ensaio caracterizou-se pela diminuição do número de peixes em cada tanque, em que metade da população foi mantida nos respetivos tanques, enquanto a restante foi introduzida em 3 novos tanques com as mesmas características, verificando-se duas novas condições: o dobro dos tanques utilizados (L1, L2, L3, L4, L5 e L6) e metade do número da população em cada um deles.

Assim que atingido o dobro do peso médio por tanque em relação ao valor inicial da etapa (T1), procedeu-se ao segundo desdobramento (T2), que manteve a mesma proporção de tanques, mas a redistribuição dos indivíduos impôs uma nova condição. Considerando o peso de cada peixe, estabeleceram-se 6 grupos finais, denominados: “crescimento rápido” (FG) (L1, L2 e L9), cujo peso médio por peixe é de 107g e o perfil de “crescimento lento” (SG) (L4, L5 e L7), cujo peso médio por peixe é de 72,5g. Entre o último desdobramento (T2) e o final do estudo (T3) decorreu o período de um mês. Na última fase do estudo, foi realizada uma última amostragem dos parâmetros biométricos (peso), prévia à colheita das amostras. No final do ensaio, foram selecionados 60 peixes (10 por tanque), com peso acima da média para os indivíduos pertencentes ao grupo FG e abaixo da média para os indivíduos pertencentes ao grupo SG.

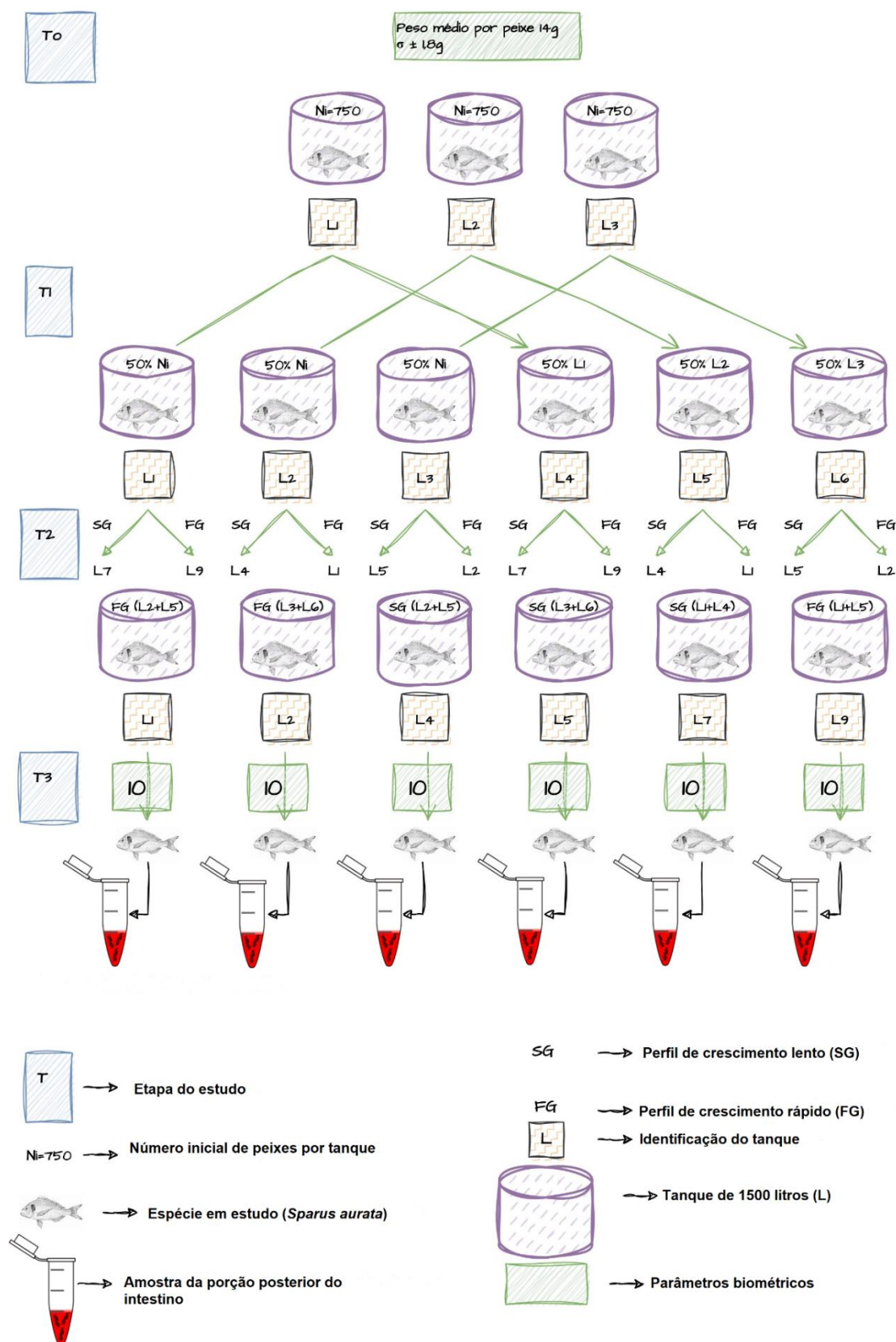


Figura 3. Fluxograma do desenho experimental. Original do autor.

3. Dieta

Foram administradas em quatro refeições diárias, as dietas granuladas Aquasoja, Neo Gold Blue de calibre (2,40 mm) e Aquasoja, Standart Orange (4,00 mm), ajustadas ao requerido pelo tamanho dos peixes. As dietas foram formuladas com farinha de peixe e com mistura de ingredientes vegetais, atualmente utilizados para a produção de dourada em aquacultura.

4. Amostragem

Todas as amostragens foram realizadas de manhã, após jejum noturno. Todos os peixes amostrados foram sedados com 100 ppm de fenoxietanol (Barata et al., 2016), previamente colocados em tinas com baixa densidade, com recurso ao anestésico de forma a minimizar o stress animal aquando da amostragem. Foram pesados com recurso a uma balança de alta precisão, de forma a calcular a biomassa por tanque. No final do estudo, todos os peixes foram pesados individualmente.

5. Métodos Analíticos

5.1 Análise do desempenho de crescimento

Para avaliar o desempenho de crescimento dos juvenis de dourada, foram calculados: Taxa de Crescimento Específica (SGR) e Taxa de crescimento relativo (RGR), de acordo com as Equações (1) e (2), respetivamente. A SGR baseou-se no logaritmo natural do peso do corpo, uma vez que é o parâmetro mais utilizado para a expressão da taxa de crescimento dos peixes e pode ser utilizado para comparar o crescimento numa base diária. Este parâmetro está dependente do peso corporal final e permite comparações das taxas de crescimento entre grupos com peso corporal inicial semelhante. O RGR foi calculado com base no peso corporal inicial e final de cada indivíduo.

$$(1) \quad \text{SGR (\%/dia)} = \frac{[\text{Ln (Peso final (g))}] - [\text{Ln (Peso inicial (g))}]}{\text{Duração do estudo (dias)}} \times 100$$

$$(2) \quad \text{RGR (\%)} = \frac{[\text{Peso final (g)}] - [\text{Peso inicial (g)}]}{\text{Peso inicial (g)}} \times 100$$

5.2 Amostragem do conteúdo gastrointestinal

Após aproximadamente 24 horas de jejum, foram amostrados 60 peixes (10 por cada tanque), foram eutanasiados, por choque térmico (gelo), (a cerca de 0 °C). De entre a colheita das 60 amostras para extração de DNA e futura sequenciação, foi recolhido 1cm da porção posterior do intestino em condições estéreis por cada peixe e colocada num tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL e conservada a -80 °C até à extração do DNA (Parma et al., 2016). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram verificadas com recurso ao NanoDrop DeNovix DS-11 FX.

5.3 Extração de DNA

A diversidade do microbioma varia de acordo com os métodos de extração de DNA utilizados (Lim et al., 2018). Comercialmente, existem vários protocolos de extração de DNA, no entanto, para identificar o método de extração mais apropriado para a análise do microbioma de uma espécie específica é sempre difícil. A extração de DNA é crucial para a análise do microbioma, exigindo qualidade e quantidade adequadas de DNA isolado para uma representação precisa do microbioma do hospedeiro (Panek et al., 2018). As 60 amostras (30 por cada perfil de crescimento) foram mantidas congeladas a uma temperatura de -80°C, tendo sido realizada a extração de DNA logo após o seu descongelamento. O DNA bacteriano total foi extraído diretamente das amostras da porção posterior de intestino, utilizando o FastDNA™ SPIN Kit for Soil, seguindo as instruções do fabricante.

5.4 Sequenciação 16S da comunidade bacteriana intestinal

O RNA ribossómico 16S (rRNA) é um componente da pequena subunidade 30S do ribossoma das células procarióticas, contendo 9 regiões híper-variáveis (V1-V9), com cerca de 30-100 pares de bases (pb), que estão envolvidas na estrutura secundária da pequena subunidade ribossómica. O grau de conservação varia entre as regiões híper-variáveis, desta forma correlacionam-se as regiões mais conservadas com uma taxonomia de grau superior e as regiões menos conservadas com graus taxonómicos inferiores, como o género e a espécie. Neste contexto, o 16S rDNA pode ser utilizado na reconstrução de filogenias e classificações bacterianas.

Neste estudo foi explorada a região 16SV4. A variação da sequência no gene 16S é amplamente utilizada para caracterizar diversas comunidades microbianas. Com o desenvolvimento contínuo de plataformas de sequenciação de elevado rendimento, a estratégia de sequenciação PE250 foi realizada através da plataforma de sequenciação Illumina atualizada. Para a classificação taxonómica, é suficiente sequenciar regiões hiper-variáveis individuais em vez de todo o gene. A tecnologia de sequenciação de amplicões de rDNA 16S torna-se gradualmente um método importante para estudar a composição e estrutura das comunidades microbianas em amostras metagenómicas.

Em regiões conservadoras, é possível conceber primers universais. A sequenciação de amplicons do rDNA 16S normalmente seleciona uma ou várias regiões hipervariáveis de interesse, o iniciador universal usado durante a amplificação da PCR é projetado a partir das regiões conservadoras que englobam as regiões hipervariáveis de interesse, o que permitirá a identificação de microrganismos das regiões hipervariáveis através de análises subsequentes (Caporaso et al., 2011; Youssef et al., 2009; Hess et al., 2011). Desde a colheita de DNA ao processamento dos dados finais, cada etapa (extração do DNA, PCR, purificação, preparação de biblioteca e sequenciação), influenciará a qualidade e quantidade dos dados obtidos. A qualidade dos dados, por sua vez, terá um impacto direto nos resultados da análise de informação subsequente. Para assegurar a precisão e confiança dos dados de sequenciação, é crucial realizar o controlo de qualidade (QC) em todas as etapas do procedimento.

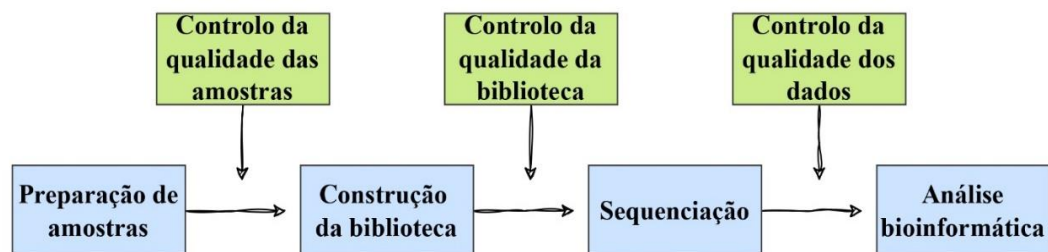


Figura 4. Sequência de operações de limpeza e controlo de qualidade das amostras para a análise bioinformática. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

5.5 Construção da biblioteca, controlo de qualidade e sequenciação

A amplificação por PCR das regiões-alvo foi efetuada utilizando primers específicos ligados a códigos de barras. Os produtos de PCR de tamanho adequado foram selecionados através de eletroforese em gel de agarose a 2%. A mesma quantidade de produtos de PCR de cada amostra foi agrupada, reparada nas extremidades e ligada com adaptadores Illumina. As bibliotecas foram sequenciadas numa plataforma Illumina de extremidade emparelhada para gerar leituras brutas emparelhadas de 250 pb. A biblioteca foi verificada com Qubit e PCR em tempo real para quantificação, enquanto um bioanalisador foi utilizado para a deteção da distribuição do tamanho. As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas em plataformas Illumina de acordo com a concentração atual da biblioteca e da quantidade de dados necessária.



Figura 5. Metodologia experimental para a preparação da biblioteca de DNA. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

5.6 Etapas de processamento de análise bioinformática

Os dados brutos obtidos por sequenciação contêm uma certa proporção de dados sujos. Para tornar os resultados da análise bioinformática mais precisos e confiáveis, procedeu-se em primeiro lugar, à junção e filtragem dos dados em bruto, para obter dados limpos. Com base nos dados limpos, foi utilizado DADA2 para reduzir o ruído (Li et al., 2020). Para as variantes de sequenciação de amplicons (ASVs) obtidas, a sequência representativa de cada ASV é anotada para se obter as informações da espécie correspondente e a distribuição da abundância com base na espécie (Callahan et al., 2017). Em seguida, são analisadas a abundância, a diversidade alfa e beta. Com base nas informações das 60 amostras sequenciadas (30 por cada perfil de crescimento), foi construído o gráfico de Venn e o mapa de calor, para se obter informações sobre a riqueza e uniformidade das amostras, assim como as informações sobre ASVs comuns e únicas entre as diferentes amostras ou grupos, para realizar o alinhamento de sequências múltiplas de ASVs e construir árvores filogenéticas. Através de análises de redução de dimensionalidade, como a exibição em árvore do agrupamento de amostras, é possível explorar as diferenças na estrutura da comunidade entre diferentes amostras ou grupos.

5.7 Análise de OTU/ASVs e anotação taxonômica

O método DADA2 (Callahan et al., 2016) é utilizado principalmente para a redução do ruído. Cada sequência desduplicada, gerada após a redução do ruído utilizando o DADA2 é designada por ASV (Amplicon Sequence Variants), ou sequência característica (correspondente à sequência representativa da OTU), e a tabela de abundância destas sequências na amostra é designada por tabela característica (corresponde à tabela OTU). O método DADA2 é mais sensível e específico do que o método OTU tradicional e pode detectar as verdadeiras mutações biológicas não detectadas pelo método OTU, produzindo menos sequências falsas (Callahan et al., 2019). Em comparação com as OTU, as ASV melhoram a exatidão, a abrangência e a repetibilidade da análise de dados de genes marcadores (Amir et al., 2017). Ao aplicar o algoritmo classify-sklearn do QIIME2 (Bokulich et al., 2018; Bolyen et al., 2019), foi utilizado um classificador Naive Bayes pré-treinado para a anotação de espécies de cada ASV, com base na base de dados de anotação Silva 138.1. Com os resultados das anotações das ASVs e as tabelas de características de cada amostra, obtemos tabelas de abundância dos membros compreendidos ao nível do filo, gênero e espécie. Estas tabelas de

abundância, juntamente com as informações de anotação, são o cerne da análise de amplicons. As diferenças foram posteriormente analisadas em função das propriedades funcionais dos géneros bacterianos em questão, tendo em conta a documentação científica descrita até à data. Deste modo, referente a esta categoria taxonómica, classificaram-se as propriedades bacterianas em duas categorias, entre as quais: “géneros benéficos” e “géneros prejudiciais” no microbioma intestinal

6. Análise estatística

Os resultados do único parâmetro biométrico analisado (peso) são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). A análise estatística correspondente ao peso dos indivíduos que constituem cada perfil, verifica a taxa de crescimento de cada perfil em cada etapa experimental, em que todos os resultados foram verificados quanto à normalidade da distribuição (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene). A análise estatística seguiu a metodologia descrita por (Zar et al.,1999). Os dados foram submetidos a uma análise de variância a um fator (one-way ANOVA) de modo a testar a existência de diferenças significativas entre os perfis de crescimento em análise. A significância estatística foi testada para $p < 0.05$. Quando os efeitos foram significativos ($p < 0.05$) procedeu-se à comparação de médias, utilizando o teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 9 para o Windows e utilizado o programa Excel para desenhar gráficos.

7. Disponibilidade dos dados

As sequências em bruto estão disponíveis na base de dados NCBI Sequence Read Archive (SRA) com a ID de BioProjeto: X204SC23091463-Z01.

8. Declaração de ética

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comité de Bem-Estar Animal do IPMA e pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) do Governo Português, de acordo com a tradução da legislação nacional Diretiva 2010/63/UE da UE. Os procedimentos só foram aplicados a animais vivos por utilizadores autorizados.

III Resultados

1. Crescimento

Todos os peixes do estudo cresceram a partir do peso médio inicial de $14 \pm 1,8$ g. No final do estudo, o peso médio final dos peixes com perfil de crescimento rápido (FG) foi de 195 ± 14 g, enquanto o peso médio final do perfil de crescimento lento (SG) foi de 139 ± 17 g, (Gráfico 3). Quanto à taxa de crescimento relativo (SGR), FG apresentou um valor percentual de 3%, enquanto o grupo SG indica um ganho de peso de 2%. Em termos da taxa de crescimento relativa (RGR), FG revela um crescimento de 1289% enquanto SG apresenta um crescimento de 894%.

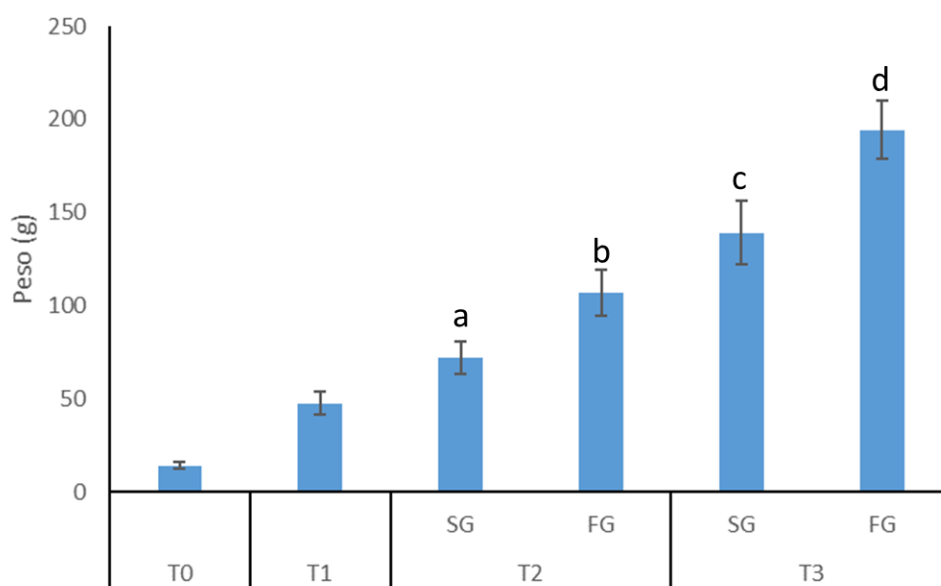


Gráfico 3. Desempenho de crescimento entre peixes com perfil de crescimento rápido (FG) e peixes com perfil de crescimento lento (SG). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$.

2. Microbioma

As Variantes de Sequência de Amplicons (ASVs) das comunidades bacterianas intestinais de douradas foram identificadas nos diferentes perfis de crescimento analisados através do processamento dos dados com o DADA2. O microbioma intestinal central dos indivíduos examinados foi obtido após a combinação de todos os resultados de taxonomia das (ASVs), (Gráfico 4). Foram identificadas um total de 24430 sequências de características, a partir das 60 amostras analisadas, entre as quais 2920 são comuns entre os dois perfis de crescimento examinados, o que corresponde a 11,95% do total identificado.

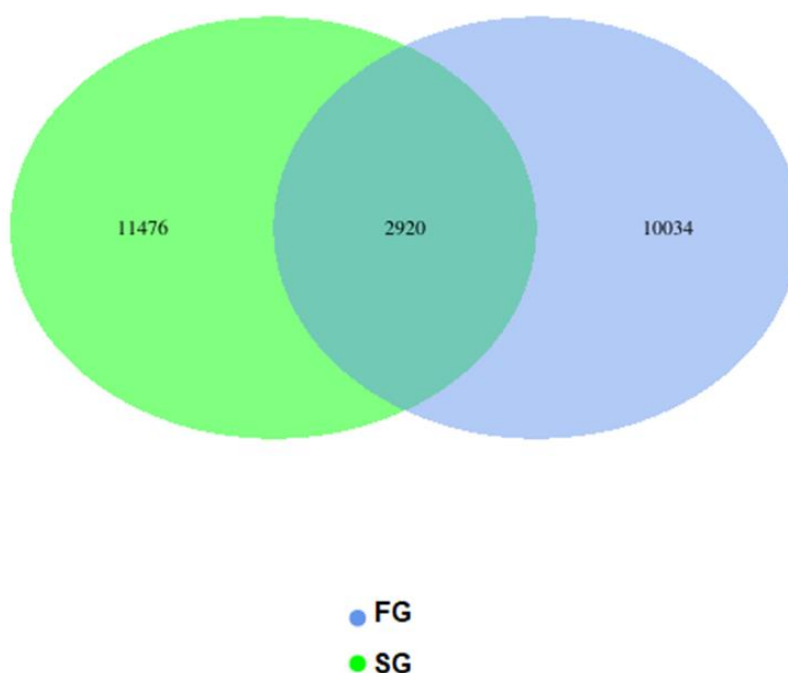
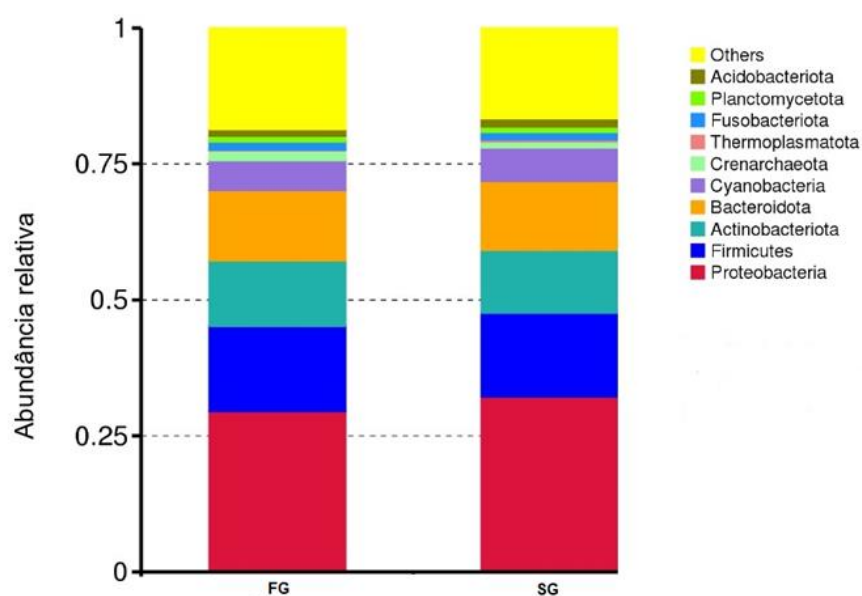


Gráfico 4. Diagrama de Venn. Representa as Variantes de Sequência de Amplicons (ASVs), comuns e únicas, observadas na comunidade bacteriana intestinal de juvenis de dourada (*Sparus aurata*), entre os perfis de crescimento: rápido (FG) e lento (SG). cada círculo representa um grupo. Os valores em partes sobrepostas representam sequências de características comuns. Os outros são sequências de características específicas de cada grupo. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

As diferenças na composição bacteriana foram caracterizadas taxonomicamente agrupando as amostras que constituem cada perfil de crescimento.

Ao nível do filo para os perfis crescimento analisados, esta análise revela a distribuição relativa dos principais filos bacterianos em ambos os perfis (Gráfico 5 (a) e (b)), proporcionando uma compreensão detalhada das diferenças taxonômicas entre FG e SG. A abundância relativa dos principais filos foi determinada, apresentando os seguintes resultados: verifica-se uma percentagem superior em FG nos filos Firmicutes (FG: 15,65%, SG: 15,40%), Actinobacteriota (FG: 12%, SG: 11,61%), Bacteroidota (FG: 12,96%, SG: 12,66%), Crenarchaeota (FG: 1,76%, SG: 1,11%), Fusobacteriota (FG: 1,49%, SG: 1,35%), Planctomycetota (FG: 1,05%, SG: 1,03%), entre outros (FG: 18,62%, SG: 16,67%). No perfil SG os filos com representação superior a FG são Proteobacteria (FG: 29,54%, SG: 32,17%), Cyanobacteria (FG: 5,47%, SG: 6,15%), Thermoplasmatota (FG: 0,20%, SG: 0,36%) e Acidobacteriota (FG: 1,26%, SG: 1,49%).

(a)



(b)

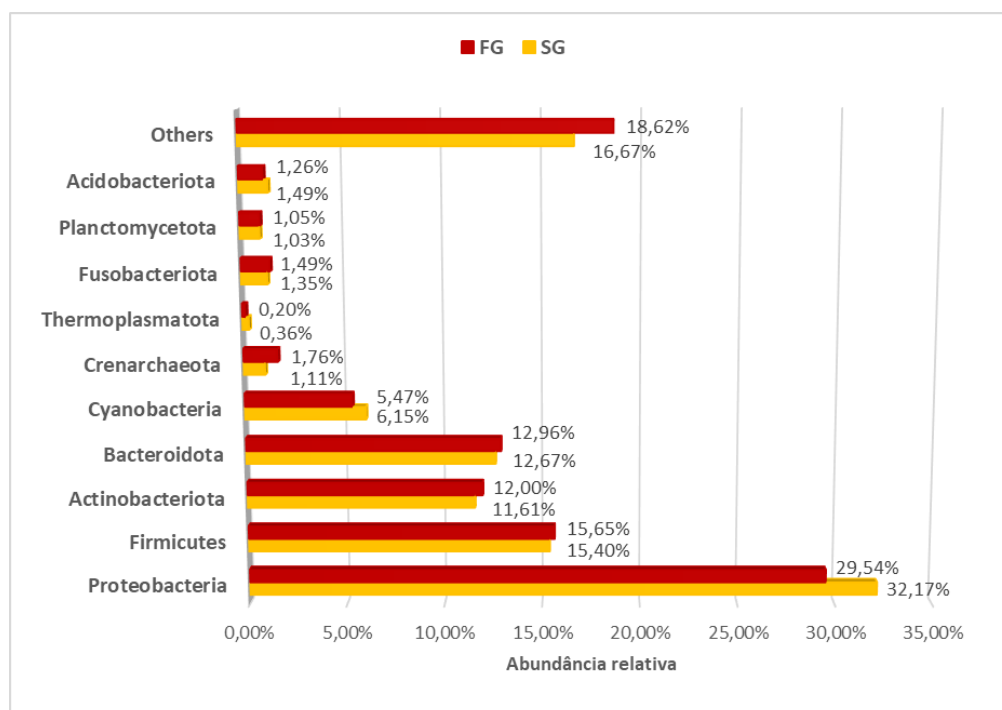


Gráfico 5 (a) e (b). Distribuição da abundância relativa dos 10 principais filos na microbiota intestinal de juvenis de dourada (*Sparus aurata*), em cada perfil de crescimento analisado, “crescimento rápido” (FG) e “crescimento lento” (SG). Reproduzido com permissão da empresa NovoGene (a).

Quanto à análise da abundância relativa referente à categoria taxonómica género na microbiota intestinal, foram identificados os 100 géneros predominantes, comuns entre os perfis FG e SG, entre os quais 58 apresentam maior abundância em FG, enquanto 41 são mais abundantes em SG e apenas 1 género apresenta a mesma abundância em ambos os perfis, (Gráfico 6). Em FG, os resultados da análise da diversidade bacteriana ao nível taxonómico género, compreendem 56,94% de todos os géneros identificados neste perfil, enquanto que no perfil SG os resultados indicam que 60,8% de todos os géneros identificados neste grupo estão compreendidos nestes resultados.

A abundância relativa referente aos principais géneros compreendidos no filo Proteobacteria verifica a presença de 30 membros identificados, entre os quais se observam 19 em maior abundância no perfil FG e 11 géneros mais abundantes em SG. Em FG destacam-se os géneros: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Unidentified Mitochondria*, *Ralstonia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Delftia*, *Enhydrobacter*, *Aeromonas*, *Roseomonas*, *Pantoea*, *2013Ark19i*, *Neisseria*, *Novosphingobium*, *Parasutterella*, *Alsobacter* e *Devosia*. De entre os géneros com

maior abundância relativa em SG, compreendidos no filo Proteobacteria, identificam-se: *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Escherichia-Shigella*, *Pseudoalteromonas*, *Proteus*, *Cupriavidus*, *Legionella*, *Paracoccus*, *Halomonas* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*.

Quanto ao filo Firmicutes, é representado por 30 gêneros presentes em ambos os perfis. 22 revelam ser mais abundantes no perfil FG, enquanto 8 gêneros revelam maior abundância em SG. De entre os gêneros com maior abundância em FG, incluem-se: *Blautia*, *Agathobacter*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Eubacterium hallii* group, *Allobaculum*, *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, *Holdemanella*, *Dorea*, *Erysipelotrichaceae* UCG-003, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus gauvreauii* group, *Dubosiella*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Fastidiosipila*, *Fingoldia*, e *Fusicatenibacter*. Entre os gêneros com maior abundância relativa em SG no filo Firmicutes, destacam-se: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerococcus*, *Veillonella* e *Lentilactobacillus*.

Relativamente ao filo Actinobacteriota, este é composto por 10 gêneros presentes em ambos os perfis. Desses, 6 são mais abundantes no perfil FG, enquanto 4 gêneros apresentam maior abundância em SG. Em maior abundância em FG, observam-se: *Cutibacterium*, *Mycobacterium*, *Rubrobacter*, *CL500-29 marine group*, *Micrococcus* e *Unidentified IMCC 26256*. Referente a este filo, dos gêneros com maior abundância relativa em SG, verificam-se: *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Lawsonella* e *Solirubrobacter*. Em relação ao filo Bacteroidota, observa-se a presença de 15 gêneros em ambos os perfis. Entre estes, 11 demonstram maior abundância no perfil FG e 4 apresentam maior abundância em SG. Incluem-se com maior abundância em FG os gêneros: *Taibaiella*, *Niabella*, *Bacteroides*, *Prevotella9*, *Runella*, *Alloprevotella*, *Shingobacterium*, *Capnocytophaga*, *Planktosalinus*, *Flavobacterium* e *Tannerella*. Ainda em relação a este filo, foram identificados mais abundantes em SG: *Prevotella7*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Cloacibacterium*.

Compreendidos filo Cyanobacteria, em maior abundância relativa no perfil FG, destaca-se apenas: *Unidentified Chloroplast*. Em SG incluem-se 2 gêneros pertencentes ao filo acima mencionado, com maior abundância relativa comparativamente, entre os quais: *Tychonema CCAP 1459-11B* e *Microcoleus Es-Yyy1400*. De entre os gêneros identificados compreendidos no filo Verrucomicrobiota, todos apresentam maior abundância relativa em FG, entre estes observam-se os gêneros: *Akkermansia*, e *Candidatus Udaeobacter*. Tal como no filo

Verrucomicrobiota, o filo Fusobacteriota compreende 2 géneros identificados nesta análise, ambos com maior abundância relativa em FG, entre eles: *Fusobacterium* e *Leptotrichia*.

A abundância relativa de todos os géneros identificados que pertencem ao filo Campylobacterota mostra-se superior em FG, entre estes géneros incluem-se: *Malaciobacter* e *Campylobacter*. Incluído no filo Gemmatimonadota, o género *Gemmatimonas* apresenta maior abundância em FG. Relativamente ao filo Acidobacteriota identificou-se 1 único género, *RB41*, com maior abundância em FG. *Deinococcus*, um género que pertence ao filo Deinococcota, apresenta maior abundância em FG. No filo Spirochaetota foi identificado o género *Treponema*, mais abundante em SG. Compreendido taxonómicamente no filo Synergistota, o género *Unidentified Synergistaceae* revela maior abundância em FG. No filo Euryarchaeota, o género identificado *Methanobacterium* apresenta uma abundância idêntica em ambos os perfis.

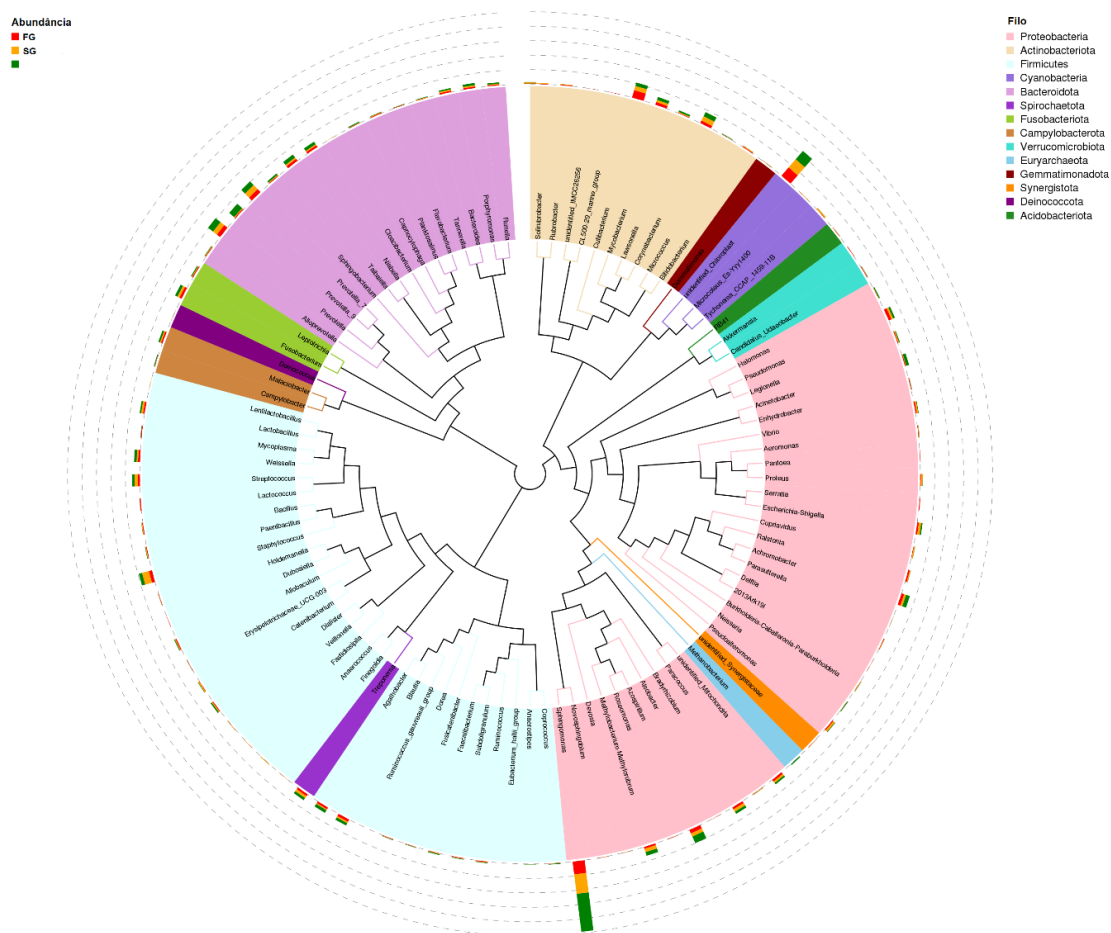


Gráfico 6. Para analisar a relação filogenética da categoria taxonómica género, foram seleccionados os 100 principais géneros comuns entre os grupos analisados e a árvore evolutiva

foi desenhada usando as sequências representativas alinhadas. Diferentes cores dos ramos representam diferentes filos. A abundância relativa de cada gênero em cada grupo foi exibida. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

Entre os 100 gêneros predominantes, comuns a ambos os perfis, identificaram-se os 35 gêneros com maior abundância relativa entre os perfis em estudo, de forma a identificar as semelhanças e diferenças entre FG e SG. Dos gêneros identificados nesta análise, 21 apresentam maior abundância em FG, enquanto 14 são mais abundantes em SG (Gráfico 7). Nesta análise, em FG estes resultados compreendem 42,1% de todos os gêneros identificados neste perfil, enquanto que em SG os resultados indicam que 46,7% de todos os gêneros identificados neste grupo estão compreendidos nesta análise. Dos 35 principais gêneros selecionados, 12 pertencem ao filo Firmicutes, dos quais 8 apresentam maior abundância relativa em FG e 4 gêneros em maior abundância em SG entre eles: *Blautia* (FG: 2,85%, SG: 1,50%), *Weissella* (FG: 2,14%, SG: 1,28%), *Agathobacter* (FG: 2,14%, SG: 1,07%), *Eubacterium hallii group* (FG: 1,19%, SG: 0,64%), *Lactococcus* (FG: 1,19%, SG: ≈0,00%), *Allobaculum* (FG: 0,95%, SG: 0,86%), *Subdoligranulum* (FG: 0,71%, SG: 0,21%) e *Mycoplasma* (FG: 0,71%, SG: ≈0,00%). Dos restantes gêneros identificados nesta análise compreendidos no filo Firmicutes, 4 apresentam maior abundância relativa em SG, entre os quais: *Staphylococcus* (FG: 3,56%, SG: 7,07%), *Streptococcus* (FG: 2,14%, SG: 3,43%), *Lactobacillus* (FG: 1,66%, SG: 1,93%) e *Anaerococcus* (FG: ≈0,00%, SG: 0,64%).

Nesta análise, relativamente ao filo Proteobacteria identificaram-se 9 gêneros, entre os quais 5 apresentam maior abundância relativa em FG, entre eles incluem-se: *Azospirillum* (FG: 4,04%, SG: 3,43%), *Achromobacter* (FG: 3,09%, SG: 2,14%), *Unidentified Mitochondria* (FG: 2,38%, SG: 1,93%), *Ralstonia* (FG: 1,66%, SG: 0,86%) e *Serratia* (FG: 0,95%, SG: ≈0,00%). Os restantes 4 gêneros do filo Firmicutes identificados nesta análise apresentam maior abundância relativa em SG, incluindo: *Sphingomonas* (FG: 14,01%, SG: 19,49%), *Escherichia-Shigella* (FG: 1,66%, SG: 2,36%), *Methylobacterium-Methylobacterium* (FG: 1,90%, SG: 3,43%) e *Bradyrhizobium* (FG: 2,38%, SG: 2,78%).

Relativamente a esta análise, foram identificados 6 gêneros referentes ao filo Bacteroidota, entre eles 4 com maior abundância em FG, incluem-se nesta lista: *Taibaiella* (FG: 2,61%, SG: 1,71%), *Niabella* (FG: 2,14%, SG: 1,28%), *Prevotella* (FG: 0,95%, SG: 0,86%) e *Bacteroides* (FG: 1,43%, SG: 1,28%). Ainda referente ao filo

acima mencionado, identificaram-se 2 géneros com maior abundância em SG, entre eles: *Prevotella*7 (FG: 4,51%, SG: 5,78%) e *Prevotella* (FG: 4,51%, SG: 4,93%).

Quanto ao filo Actinobacteriota, registou-se a presença de 5 géneros nesta análise, entre os quais 2 apresentam maior abundância em FG, destacando-se: *Cutibacterium* (FG: 8,31%, SG: 4,50%) e *Mycobacterium* (FG: 3,09%, SG: 2,36%). Os restantes 3 géneros pertencentes ao filo *Actinobacteriota* registados nesta análise, mostram maior abundância relativa em SG, destacando-se entre eles: *Corynebacterium* (FG: 3,09%, SG: 4,93%), *Bifidobacterium* (FG: 0,71%, SG: 0,86%) e *Lawsonella* (FG: 0,48%, SG: 0,86%). Nesta análise, o filo Cyanobacteria apresenta-se representado apenas por 1 género, com maior abundância em FG: *Unidentified Chloroplast* (FG: 12,11%, SG: 10,71%). No filo Fusobacteriota, o único género identificado na análise apresenta maior abundância relativa em FG: *Fusobacterium* (FG: 2,61%, SG: 2,36%). O filo Spirochaetota destaca a presença exclusiva de 1 género, mais abundante em SG: *Treponema* (FG: 2,14%, SG: 2,57%).

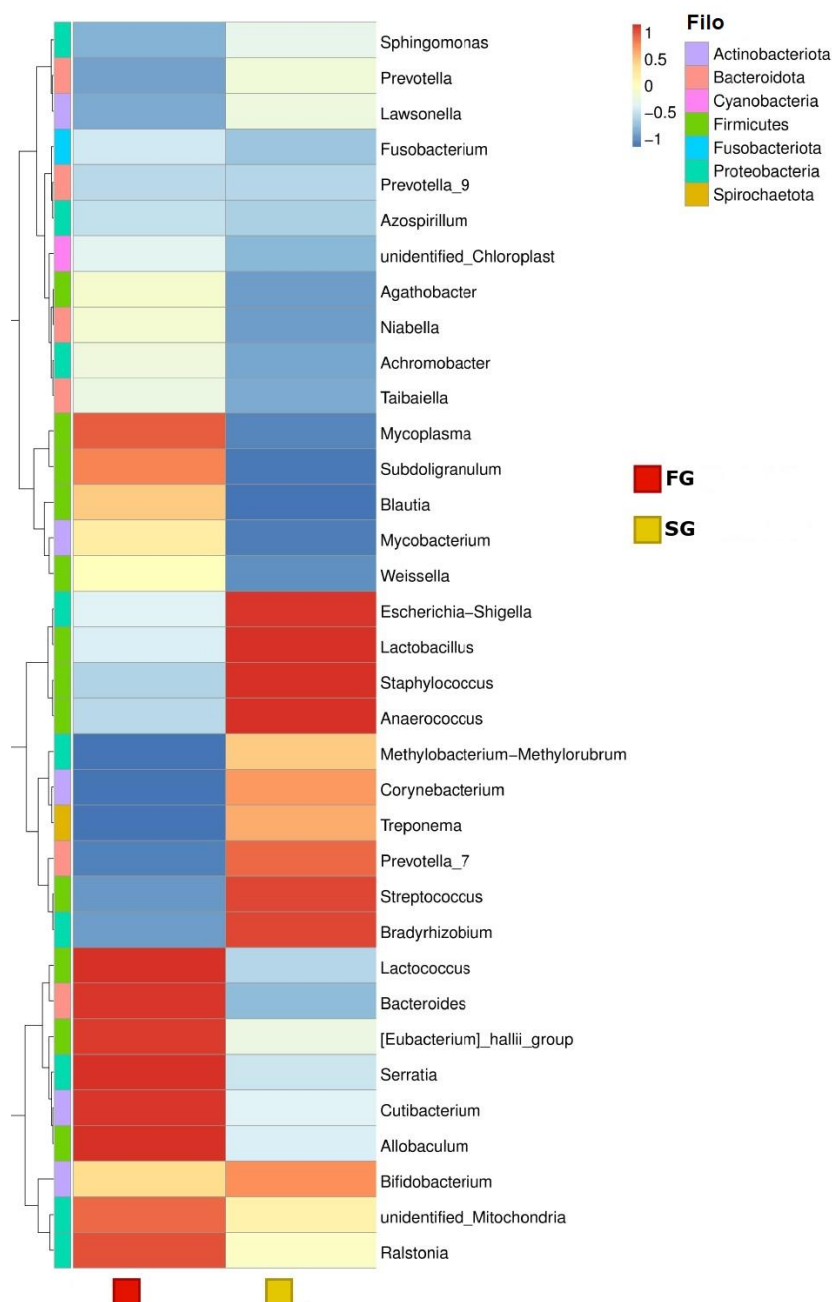


Gráfico 7. De acordo com as informações de abundância relativa dos 35 principais gêneros comuns entre os grupos analisados, foi elaborado um mapa de calor para verificar se as amostras dos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), estão agrupadas. O mapa de calor permite observar as semelhanças e diferenças entre os dois grupos. A coloração no mapa de calor indica a distância entre a pontuação bruta e a média, medida pelo valor absoluto de «Z». Um valor de «Z» negativo indica que a pontuação bruta está abaixo da média, enquanto um valor de «Z» positivo indica que está acima da média. Esta representação gráfica facilita a visualização das variações na abundância relativa da categoria taxonômica gênero, entre os diferentes perfis de crescimento, permitindo uma análise comparativa precisa e eficiente. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

Tendo em conta a abundância relativa dos 35 géneros bacterianos predominantes, partilhados entre os dois perfis de crescimento, foram categorizados e agrupados de acordo com as suas funções biológicas. Identificaram-se 22 géneros com potenciais mecanismos de ação benéficos na microbiota intestinal (Gráfico 8), 8 géneros que apresentam mecanismos de ação prejudiciais (Gráfico 9).

Relativamente aos principais géneros com mecanismos de ação benéficos na microbiota intestinal, 15 apresentam maior abundância relativa em FG. Entre estes géneros, 7 pertencem ao filo Firmicutes, entre os quais: *Blautia*, *Weissella*, *Agathobacter*, *Eubacterium hallii* group, *Lactococcus*, *Allobaculum* e *Subdoligranulum*. Compreendidos no filo *Proteobacteria*, apresentam-se 4 géneros, entre eles: *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Ralstonia* e *Serratia*. Referente ao filo Bacteroidota, observam-se 3 géneros, respetivamente: *Taibaiella*, *Prevotella*9 e *Bacteroides*. No filo *Actinobacteriota*, destaca-se a presença de um único género identificado: *Cutibacterium*. Nesta análise, com maior abundância relativa em SG, observam-se 7 géneros, entre os quais, 2 pertencem ao filo Firmicutes: *Anaerococcus* e *Lactobacillus*. No filo *Proteobacteria* foi identificado 1 único género: *Bradyrhizobium*, enquanto no filo Bacteroidota apresentam-se 2 géneros: *Prevotella*7 e *Prevotella*. Incluído no filo *Actinobacteriota*, identificou-se 1 género: *Bifidobacterium*. Ainda nesta análise, pertencente ao filo *Spirochaetota*, foi identificado 1 único género: *Treponema*.

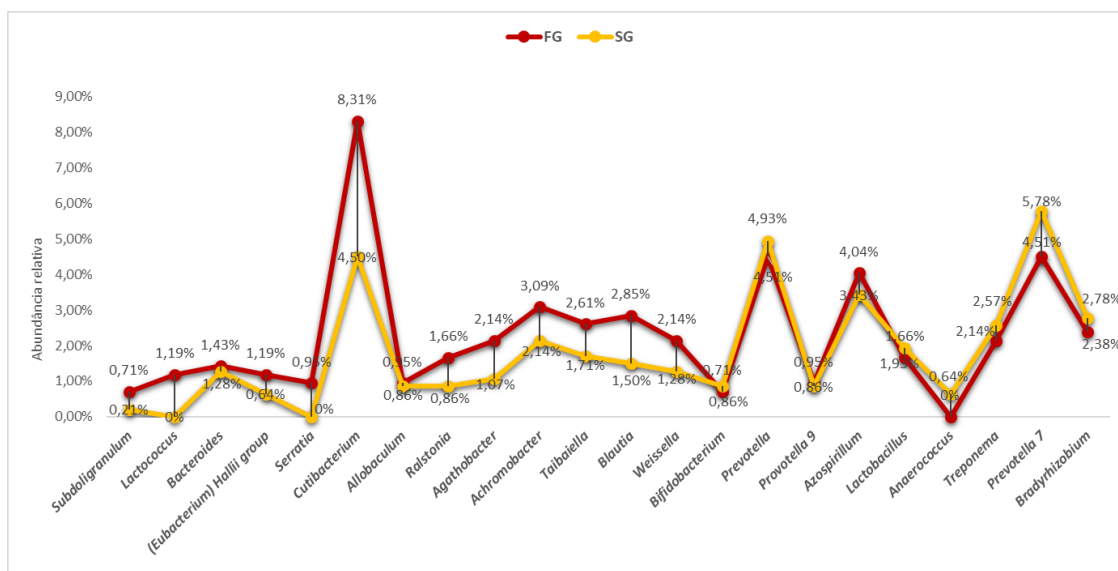


Gráfico 8. Distribuição da abundância relativa dos principais géneros taxonómicos comuns entre dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG) com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal.

Relativamente aos 8 géneros identificados que apresentam mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal, apenas 2 apresentam maior abundância relativa em FG. Inclui-se nesta lista 1 género filogeneticamente associado ao filo Actinobacteriota: *Mycobacterium* e 1 género que pertence ao filo Fusobacteriota: *Fusobacterium*. Referente a esta análise, em SG foram identificados 6 géneros com maior abundância relativa, entre os quais se destacam, 2 géneros incluídos no filo Proteobacteria: *Escherichia-Shigella* e *Methylobacterium-Methylobacterium*, 2 géneros pertencentes ao filo Firmicutes: *Staphylococcus* e *Streptococcus*, 1 género compreendido no filo Actinobacteriota: *Corynebacterium* e ainda 1 género que pertence ao filo Actinobacteriota: *Lawsonella*.

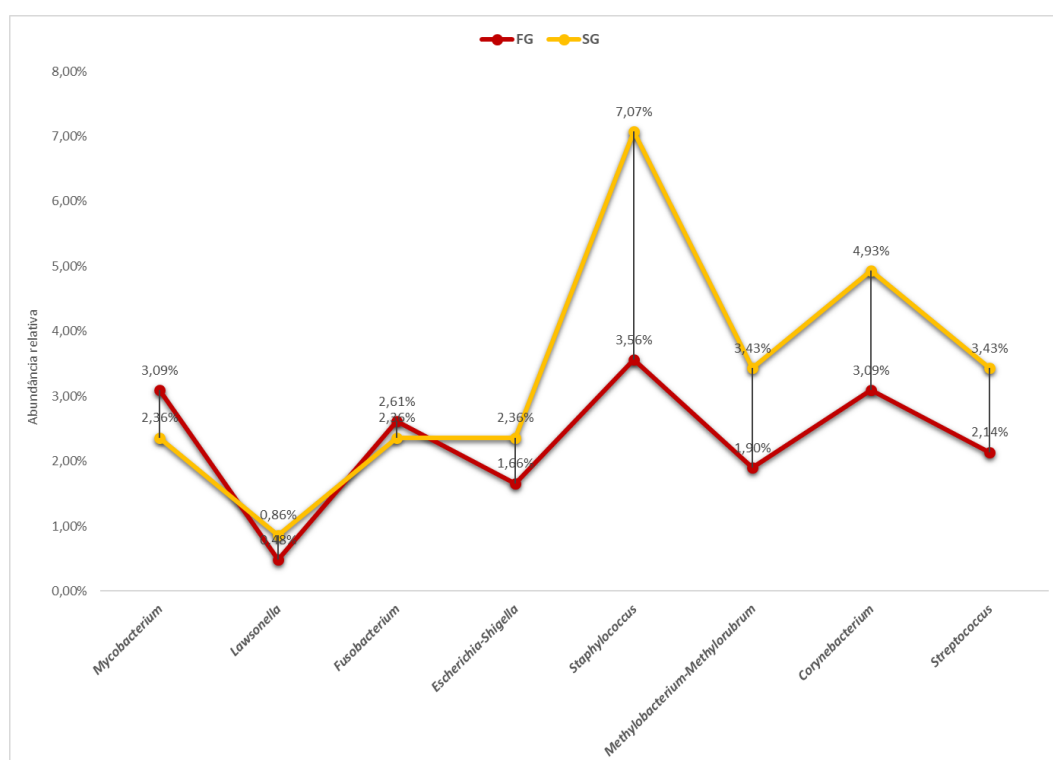


Gráfico 9. Distribuição da abundância relativa dos principais géneros taxonómicos comuns entre os dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), com mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal.

Em relação à análise da categoria taxonómica espécie, foram selecionadas as 35 espécies com maior abundância relativa, comuns entre os perfis estudados, de forma a identificar as semelhanças e diferenças entre FG e SG. Das espécies identificadas nesta análise, 16 apresentam maior abundância em FG, 13 são mais abundantes em SG, enquanto 6 apresentam a mesma abundância em ambos os perfis

(Gráfico 10). Relativamente ao perfil FG, os resultados desta análise compreendem 6,2% do total de espécies bacterianas identificadas neste grupo, enquanto que em SG os resultados provenientes da mesma análise representam 6,8% do total identificado.

Das 35 principais espécies identificadas, 14 estão agrupadas taxonomicamente no filo Bacteroidota. Destas espécies, 5 apresentam maior abundância em FG, 7 apresentam maior abundância em SG e 2 a mesma abundância em ambos os perfis. *Prevotella*, o género mais representado, com 7 espécies a integrarem esta lista, apresenta apenas 1 espécie com maior abundância em FG: *P. melaninogenica* (FG: 3,23%, SG: 2,94%). Entre as espécies incluídas no género *Prevotella*, verificam-se 6 com maior abundância em SG, entre as quais: *P. nigrescens* (FG:11,29%, SG:14,71%), *P. oris* (FG: 6,45%, SG: 8,82%), *P. pleuritidis* (FG: 4,84%, SG: 5,88%), *P. denticola* (FG: 9,68%, SG: 11,76%), *P. veroralis* (FG: 3,23%, SG: 5,88%) e *P. sp. oral clone AH125* (FG: 1,61%, SG: 2,94%). Membro do filo acima mencionado, o género Bacteroides apresenta maior abundância em FG relativamente à espécie *B. plebeius* (FG: 1,61%, SG: ≈0,00%), já a espécie *B. stercoris* apresenta a mesma abundância em ambos os perfis, ≈0,00%. Ainda referente ao filo Bacteroidota, foram registadas mais algumas espécies que não partilham o mesmo género, das quais 3 apresentam maior abundância em FG, respetivamente: *Taibaiella* sp. (FG: 16,13%, SG: 11,76%), *Porphyromonas endodontalis* (FG: 8,06%, SG: 7,35%) e *Tannerella forsythia* (FG: 1,61%, SG: 1,47%). Em SG, registou-se maior abundância referente à espécie *Alloprevotella tanneriae* (FG: 1,61%, SG: 2,94%), enquanto a espécie *Capnocytophaga sputigena* apresenta a mesma abundância nos dois perfis, ≈0,00%.

De entre as restantes espécies seleccionadas por esta análise, 10 pertencem ao filo Firmicutes, entre estas, 4 apresentam maior abundância em FG, 4 apresentam maior abundância em SG e 2 apresentam a mesma abundância em ambos os perfis. O género *Blautia* é o mais representado, com 3 espécies identificadas. Entre elas, observam-se 2 com maior abundância em FG, entre as quais: *B. obeum* (FG: 3,23%, SG: 1,47%) e *B. faecis* (FG: 1,61%, SG: ≈0,00%). A espécie *B. sp. Marseille-P3087* apresenta a mesma abundância nos perfis em análise, ≈0,00%. Incluídas no mesmo filo, identificaram-se 2 espécies a nível do género *Streptococcus*, ambas com maior abundância em SG, entre elas: *S. dysgalactiae* (FG: ≈0,00%, SG: 2,94%) e *S. sp. FF10* (FG: ≈0,00%, SG: 1,47%). Nesta análise, observam-se mais 5 espécies compreendidas no filo Firmicutes, entre as quais todas de géneros diferentes. Destas, apresentam maior abundância em FG as espécies: *Dorea formicigenerans* (FG:

1,61%, SG: $\approx 0,00\%$) e *Mycoplasma penetrans* (FG: 1,61%, SG: $\approx 0,00\%$). Das restantes espécies identificadas que pertencem a este filo, são mais abundantes em SG: *Lactobacillus iners* (FG: 3,23%, SG: 4,41%) e *Dialister pneumosintes* (FG: 1,61%, SG: 2,94%), já a espécie *Anaerococcus vaginalis* apresenta uma abundância comum entre os perfis, $\approx 0,00\%$.

Ainda referente aos resultados desta análise, o filo Actinobacteriota é representado por 4 espécies, entre as quais, 2 apresentam-se mais abundantes em FG, enquanto as restantes apresentam a mesma abundância nos 2 perfis. Incluídas no género *Corynebacterium*, com maior abundância no perfil FG, identificou-se a espécie: *C. matruchotii* (FG: 1,61%, SG: 1,47%), enquanto espécie a *C. glucuronolyticum* apresenta a mesma abundância em ambos os perfis, $\approx 0,00\%$. Identificaram-se mais 2 espécies também compreendidas neste filo, entre as quais, com maior abundância em FG: *Cutibacterium granulosum* (FG: 1,61%, SG: $\approx 0,00\%$), enquanto a espécie *Actinobacteria bacterium IMCC26256*, apresenta uma abundância comum aos perfis em análise, $\approx 0,00\%$.

Nesta análise foram identificadas mais 7 espécies, filogeneticamente ímpares a nível das categorias taxonómicas filo e género, entre elas, 5 revelam maior abundância em FG, enquanto as restantes são mais abundantes em SG. Com maior abundância em FG, observam-se as espécies: *Campylobacter concisus* (FG: 1,61%, SG: $\approx 0,00\%$) que pertence ao filo *Campylobacterota*, a espécie *Treponema lecithinolyticum* (FG: 1,61%, SG: 1,47%) que pertence ao filo *Spirochaetota*, a espécie *Candidatus saccharibacteria bacterium UB2523* (FG: 1,61%, SG: $\approx 0,00\%$) compreendida no filo *Candidatus saccharibacteria*, a espécie *Akkermansia muciniphila* (FG: 3,23%, SG: $\approx 0,00\%$) que se inclui no filo *Verrucomicrobiota* e a espécie *Eimeria praecox* (FG: 1,61%, SG: $\approx 0,00\%$) compreendida no filo *Apicomplexa*. Com maior abundância em SG, observam-se 2 espécies, entre elas: *Pseudanabaena sp. SCSIO S3* (FG: $\approx 0,00\%$, SG: 1,47%) que pertence ao filo *Cyanobacteria* e a espécie *Legionella thermalis* (FG: 4,84%, SG: 5,88%) que se inclui no filo *Proteobacteria*.

Considerando a abundância relativa das 35 espécies bacterianas predominantes, comuns entre os dois perfis estudados, foram classificadas e agrupadas de acordo com sua funcionalidade. Identificaram-se 7 espécies com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal (Gráfico 11), 13 espécies que apresentam mecanismos de ação prejudiciais (Gráfico 12). Entre as espécies identificadas nesta análise, com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal, todas apresentam maior abundância em FG, entre as quais se verifica a

presença de 2 espécies que pertencem ao filo Bacteroidota, respetivamente: *Taibaiella* sp. e *Bacteroides plebeius*. O filo Firmicutes é representado por 3 espécies, 2 incluídas no género *Blautia*, entre elas: *B. obeum* e *B. faecis* e ainda se inclui neste filo a espécie: *Dorea formicigenerans*. Identificaram-se mais 2 espécies, filogeneticamente diferentes, entre elas: *Akkermansia muciniphila*, que pertence ao filo Verrucomicrobiota e a espécie *Cutibacterium granulosum*, que se inclui no filo Actinobacteriota.

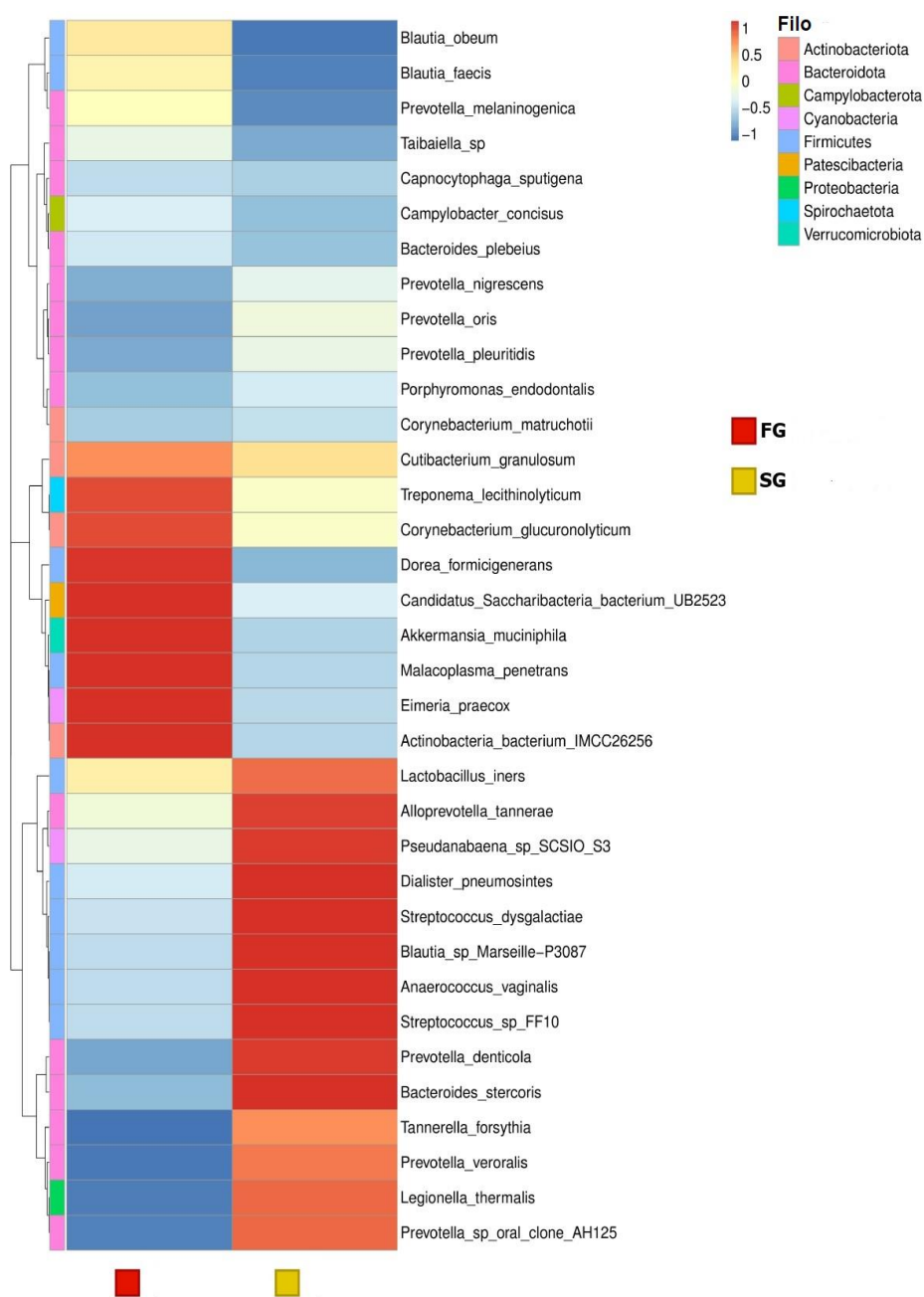


Gráfico 10. Abundância relativa das 35 espécies predominantes comuns entre os grupos analisados. Com o propósito de avaliar a possível agregação das amostras nos dois perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), bem como de identificar as semelhanças e diferenças entre os perfis de crescimento, foi elaborado um mapa de calor. O valor absoluto de «z» foi utilizado para quantificar a distância entre a pontuação bruta e a média do desvio padrão. Um valor de «z» negativo indica que a pontuação bruta está abaixo da média, enquanto um valor positivo sugere o contrário. Reproduzido com permissão da empresa NovoGene.

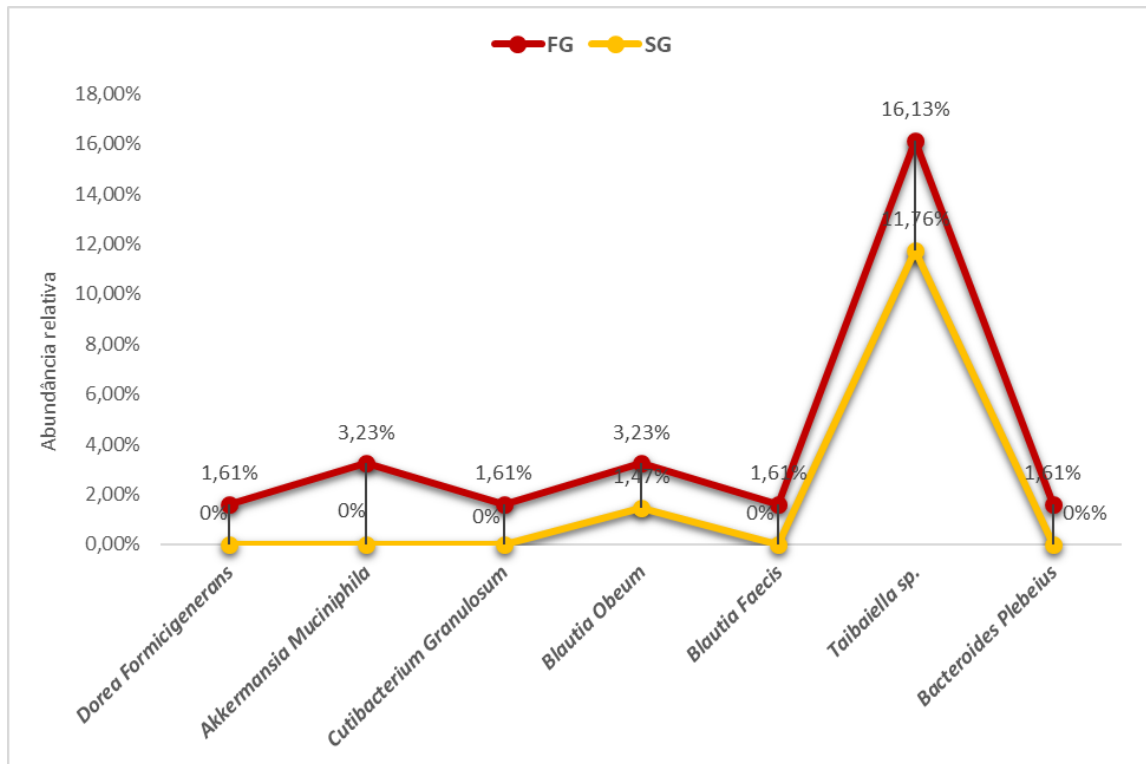


Gráfico 11. Distribuição da abundância relativa das principais espécies taxonômicas comuns entre os perfis, "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG), com mecanismos de ação benéficos no microbioma intestinal.

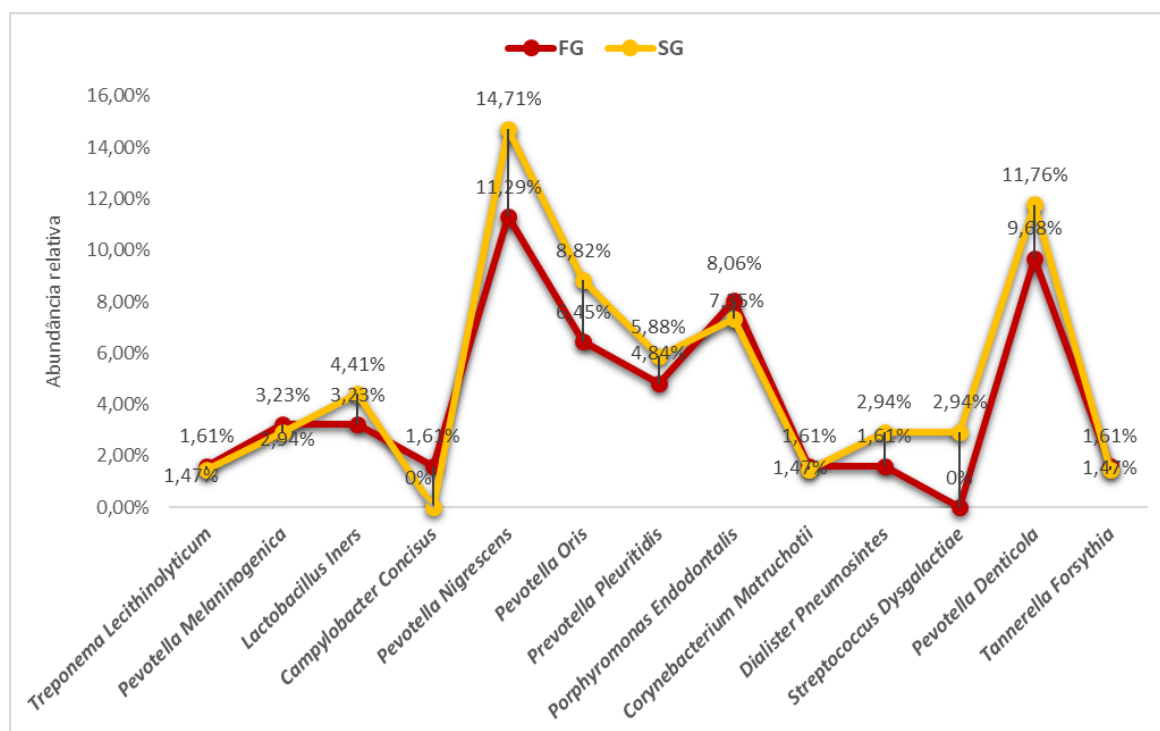


Gráfico 12. Distribuição da abundância relativa das principais espécies taxonômicas comuns entre os perfis "crescimento rápido" (FG) e "crescimento lento" (SG) com mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal.

Considerando a abundância relativa das 13 espécies identificadas, comuns aos perfis FG e SG, que revelam mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal, 6 apresentam maior abundância em FG, enquanto 7 são mais abundantes em SG. Em maior abundância no perfil FG, identificam-se 3 espécies incluídas no filo Bacteroidota, entre as quais: *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Tannerella forsythia*. Também foram identificadas em maior abundância neste perfil as espécies: *Treponema lecithinolyticum* que se inclui no filo *Spirochaetes*, *Corynebacterium matruchotii* que pertence ao filo Actinobacteriota e ainda *Campylobacter concisus*, compreendida no filo *Campylobacterota*. Relativamente às espécies identificadas em maior abundância no perfil SG, destacam-se 4, filogeneticamente compreendidas nas mesmas categorias taxonômicas referentes a filo e género. Incluídas no filo Bacteroidota e no género *Prevotella*, observam-se: *P. nigrescens*, *P. denticola*, *P. oris* e *P. pleuritidis*. Ainda se identificaram mais 3 espécies em maior abundância no perfil SG, todas elas pertencem ao filo Firmicutes, entre as quais: *Lactobacillus iners*, *Dialister pneumosintes* e *Streptococcus dysgalactiae*.

IV Discussão

O crescimento dos peixes em aquacultura apresenta muitas vezes dispersão de tamanhos, o que leva normalmente a triagens ou diversidade de tamanhos na altura da venda, com implicações comerciais. Entre as causas apontadas para a dispersão de tamanhos dos peixes produzidos em aquacultura, a composição do microbioma intestinal tem sido referida por vários autores (Butt & Volkoff, 2019; Org et al., 2015). A caracterização da composição e abundância da diversidade microbiana residente no microbioma intestinal, em espécies de peixes economicamente importantes como a dourada, é de extrema importância para uniformizar a performance de crescimento desta espécie em explorações piscícolas, visando maximizar o escoamento da produção, mitigando as perdas económicas atuais (FAO, 2022). Neste contexto, foi caracterizado o microbioma intestinal em diferentes perfis de crescimento (FG e SG) em dourada, através da análise das diferenças e semelhanças taxonómicas nas comunidades microbianas intestinais, utilizando as OTUs e ASVs a nível do gene 16S rRNA, tal como (Small et al., 2019).

No final do ensaio, após 102 dias, obtivemos uma dispersão de tamanhos, relativamente aos perfis FG e SG, entre 1289% e 894%, considerado estatisticamente diferente. Quando se analisa o microbioma destes dois grupos de peixes FG e SG verificamos que a composição qualitativa e quantitativa das comunidades bacterianas presentes no microbioma intestinal revelam diferenças entre as categorias taxonómicas analisadas, a nível do filo, género e espécie, respetivamente. Quanto à análise da categoria taxonómica filo no microbioma intestinal, os resultados indicam que ambos os perfis partilham a predominância dos 10 principais filós. O filo Proteobacteria revela ser o mais abundante em ambos os perfis, com maior representatividade em SG (32,17%) relativamente a FG (29,54%). Este é um filo amplamente observado no microbioma de diversas espécies marinhas, devido às suas propriedades metabólicas altamente flexíveis, entre os membros desta categoria taxonómica, predominam organismos anaeróbios facultativos (Ikeda-Ohtsubo et al., 2018). Os membros deste filo podem multiplicar-se e sobreviver em condições aquáticas, tirando partido de reservatórios ambientais fora dos seus hospedeiros, o que ajuda a explicar por que razão estas bactérias são relativamente comuns no trato gastrointestinal dos peixes (Rawls et al., 2006).

Observa-se também que o filo Firmicutes é o segundo mais representado em ambos os perfis, com maior incidência em FG (15,65%), ligeiramente superior à sua

abundância em SG (15,40%). Alguns membros do filo Firmicutes são responsáveis pela síntese de várias enzimas envolvidas na digestão e absorção de fibras, são fundamentais na absorção de ácidos gordos e no metabolismo lipídico, desempenhando um papel importante na promoção da absorção de nutrientes (Smriga et al., 2010). Além disso, uma diminuição de Firmicutes pode induzir a diminuição da fermentação intestinal e consequentemente um menor número de células epiteliais intestinais, devido à diminuição de ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs) disponíveis (Marx, 2015). Quanto ao filo Actinobacteriota, o terceiro mais representado em ambos os perfis, apresenta maior abundância em FG (12%) em comparação com a sua abundância em SG (11,61%). Os membros deste filo são na sua maioria residentes permanentes no intestino de vários peixes, considerados bons produtores de metabolitos secundários (Steinberg, 2018) e atuam no metabolismo da degradação de hidratos de carbono (Flint et al., 2012). O filo Bacteroidota surge como o quarto mais representado entre os perfis em análise, a sua abundância é superior em FG (12,96%) em comparação com SG (12,67%). Os membros deste filo podem contribuir para o processo digestivo, fornecendo uma variedade de enzimas, tal como estudado nos peixes: papagaio (*Scaridae*), pargo (*Pagrus pagrus*) e cirurgião (*Acanthurus chirurgus*) (Smriga et al., 2010).

Cyanobacteria, o quinto filo mais representado, demonstra maior abundância em SG (6,15%) relativamente a FG (5,47%). Em termos da sua abundância, o filo Cyanobacteria é considerado como transitório (Ye et al., 2014), relacionado particularmente com o consumo de alimentos (Givens et al., 2015). Dos restantes fillos predominantes em ambos os perfis (Crenarchaeota, Thermoplasmatota, Fusobacteriota, Planctomycetota e Acidobacteriota) verifica-se que a sua abundância relativa é inferior a 2% em ambos os perfis. Entre estes, destaca-se a relevância do filo Fusobacteriota, cuja abundância relativa é superior em FG, também descrito como um colonizador comum do intestino do peixe-zebra (*Danio rerio*) (Roeselers et al., 2011). Em geral, as estirpes bacterianas compreendidas neste grupo taxonómico podem produzir butirato (Kapatral et al., 2003) e vitaminas (Roeselers et al., 2011), tal como demonstrado pelo estudo de (Tsuchiya et al., 2008) que correlacionou alguns membros deste filo com o metabolismo da vitamina B12, sugerindo que pode ter influência favorável no desenvolvimento e homeostasia dos peixes. Em termos gerais, os resultados provenientes da análise da categoria taxonómica filo sugerem que estes são consistentes com alguns estudos anteriores, que identificaram os fillos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteriota e Bacteroidota como dominantes na microbiota autóctone intestinal em douradas (Estruch et al., 2015; Piazzon et al., 2020).

A nível da análise da abundância relativa referente à categoria taxonómica género, foram identificados os 100 predominantes, comuns aos perfis FG e SG (Gráfico 4). Entre estes, 58 apresentam maior abundância em FG, 41 são mais abundantes em SG e apenas 1 género apresenta a mesma abundância em ambos os perfis. Filogeneticamente, estes géneros estão compreendidos em 14 filós diferentes, com maior representatividade numérica inerente aos filós Proteobacteria e Firmicutes (ambos representados por 30 géneros), sendo que no primeiro observam-se 19 géneros com maior abundância em FG, enquanto 11 são mais abundantes em SG. Entre os membros do filo Firmicutes, 22 géneros apresentam maior abundância em FG e apenas 8 são mais abundantes em SG. O filo Bacteroidota, apesar de apresentar uma abundância relativa inferior ao filo Actinobacteriota em ambos os perfis, apresenta uma maior diversidade de géneros compreendidos neste estudo, com 15 membros incluídos, dos quais, 11 são mais abundantes em FG, sendo os restantes mais abundantes em SG.

Em relação aos géneros compreendidos no filo Actinobacteriota, incluem-se 10 nesta lista, entre os quais, 6 revelam maior abundância relativa em FG, enquanto 4 são mais abundantes em SG. O filo Cyanobacteria inclui 3 géneros, apenas 1 mais abundante em FG, enquanto os restantes 2 géneros apresentam-se em maior abundância em SG. Os filós Verrucomicrobiota, Fusobacteriota e Campylobacterota, apresentam a mesma quantidade de membros em relação à categoria taxonómica género, com 2 géneros representados, todos com maior abundância relativa em FG. Em relação aos filós Gemmatimonadota, Acidobacteriota, Deinococcota e Synergistota, cada um apresenta apenas um género representado. Destes, todos revelam maior abundância no perfil de crescimento FG. Relativamente ao filo Spirochaetota, é representado por 1 único género, cuja abundância é superior em SG. Com a mesma abundância em ambos os perfis, o filo Euryarchaeota inclui, também, apenas 1 género.

Dos 100 géneros predominantes, comuns entre FG e SG, seleccionaram-se os 35 mais abundantes a ambos os perfis (Gráfico 7). Com base na diferença quantitativa destes géneros, é possível compreender que a este nível taxonómico existem padrões que diferem entre os perfis. Deste modo, referente a esta categoria taxonómica, classificaram-se as propriedades bacterianas em duas categorias, entre as quais: “géneros benéficos” e “géneros prejudiciais” no microbioma intestinal, (Gráfico 8) e (Gráfico 9), respetivamente.

De entre os géneros classificados como benéficos no microbioma intestinal em FG e SG (Gráfico 8), identificam-se 22, com destaque para 15 géneros com maior abundância relativa em FG, comparativamente a 7 géneros mais abundantes em SG. Dos géneros com maior abundância em FG, 7 incluem-se no filo Firmicutes, entre os quais: *Blautia* com 2,85% (quase o dobro de SG). A maioria das propriedades deste género estão ligadas às suas potenciais funções probióticas, através da produção de AGCCs, que baixam o pH intestinal e promovem a resistência à colonização do intestino por parte de bactérias patogénicas (X. Liu et al., 2021). Sendo um género dominante do microbioma intestinal, pode também afetar a composição da microbiota, desempenhando um papel importante na manutenção da homeostasia intestinal e na prevenção da inflamação através da regulação positiva das células T, reguladoras intestinais (X. Zhang et al., 2015).

O género *Weissella*, tal como o género anteriormente mencionado, apresenta quase o dobro da abundância em FG, com 2,14%. Este género contém algumas espécies descritas com propriedades probióticas e pré-bióticas, e atividade antibacteriana com viabilidade em várias matrizes, incluindo o trato gastrointestinal de humanos e animais (Fessard & Remize, 2017; Pabari et al., 2020). A weisselicina, uma bacteriocina produzida por *Weissella*, pode atrair o interesse da investigação como agente antibacteriano natural na indústria alimentar e pode ser um potencial candidato para substituir antibióticos no tratamento de agentes patogénicos multirresistentes (Teixeira et al., 2021). *Agathobacter* apresenta a mesma abundância que o género *Weissella* em FG (2,14%), assim como sensivelmente a mesma diferença entre os perfis. Embora possa produzir diretamente butirato e acetato (Rosero et al., 2016), podem também influenciar indiretamente as quantidades de AGCCs através da interação com outras bactérias que não os produzem, através da fermentação anaeróbia de hidratos de carbono de difícil digestão, como o amido ou fibras alimentares (Jing et al., 2023).

Quanto à abundância de *Eubacterium hallii group*, tal como os géneros anteriormente mencionados, verifica-se o dobro em FG, 1,19%. É uma bactéria comensal que produz butirato e propionato a partir de metabolitos de fermentação, mas que não consegue degradar oligo e polissacáridos complexos (Scott et al., 2014). Este género é considerado uma espécie-chave para a cadeia trófica intestinal, com o potencial para afetar o equilíbrio metabólico (Engels et al., 2016). O género *Lactococcus* apresenta uma abundância de 1,19% em FG, enquanto em SG demonstra-se praticamente ausente. Relativamente a este género, foi relatado como

capaz de aumentar o crescimento dos peixes e reforçar o sistema imunitário contra agentes patogénicos em peixes (Sun et al., 2012; Xia et al., 2018). Num estudo realizado com a espécie Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após a suplementação com *Lactococcus* spp. na dieta, verificou-se um aumento significativo da densidade e do comprimento das microvilosidades intestinais em comparação com a dieta basal. O aumento da densidade e do comprimento das microvilosidades aumenta a área de superfície de absorção do intestino e reduz a exposição das proteínas da junção estreita (TJ) aos fatores de stress, como metais pesados e agentes patogénicos (Xia et al., 2018).

Quanto ao género *Allobaculum*, apresenta uma ligeira diferença relativamente à sua abundância entre os perfis, sendo superior em FG, 0,95%. Este género é responsável pela produção de AGCCs, principalmente butirato e também lactato durante o metabolismo da glucose (Greetham et al., 2004). O butirato é um AGCC crucial pela sua interação na manutenção da homeostasia imunitária (Chang et al., 2014; P. M. Smith et al., 2013) e é uma fonte de energia significativa para muitas bactérias comensais no intestino (Bourassa et al., 2016). O género *Subdoligranulum* representa 0,71% desta categoria taxonómica em FG, mais do triplo do que se observa em SG. Embora o seu papel fisiológico exato permaneça em parte desconhecido, sabe-se que é um organismo produtor de butirato (AGCC), e vários estudos sugerem um efeito probiótico promissor no metabolismo do hospedeiro (Van Hul et al., 2020). Tem sido associado à produção de antioxidantes, à prevenção da inflamação intestinal e à afiliação com microrganismos intestinais benéficos (Ma et al., 2017), como *Bacteroides*, os quais demonstram facilitar a absorção de nutrientes, manter a integridade da barreira da mucosa intestinal e promover a saúde do sistema imunitário (Holscher, 2017; Mazmanian et al., 2005).

Ainda referente aos géneros com propriedades benéficas no microbioma com maior abundância em FG, destacam-se 4 que se incluem no filo Proteobacteria, entre eles: *Azospirillum*, com uma abundância de 4,04%. Este género apresenta propriedades prebióticas, com ação na integridade do sistema digestivo, positivamente correlacionadas com a homeostasia imunitária e podem alterar a flora intestinal em benefício do hospedeiro (Dawood et al., 2020). De acordo com estas características, foi testada a inoculação de alimento com a bactéria *Azospirillum* sp. que demonstrou ter um impacto positivo no desempenho de crescimento da carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Length, 2023). O género *Achromobacter* revela uma abundância de 3,09% em FG, com uma superioridade aproximadamente de 1% em relação a SG. Descrito como

um género dominante no intestino dos peixes (Egerton et al., 2018), possui uma via de biodegradação no seu genoma particularmente interessante, relacionada com a decomposição de xenobióticos e contaminantes ambientais, como os nanoplásticos (Marzec-Grządziel & Gałązka, 2023). De entre a diversidade de enzimas encontradas nas espécies de *Achromobacter*, verifica-se que são produzidas enzimas proteolíticas, lipases, proteases bacteriolíticas, celulasas e beta-lactamases (Miyazawa et al., 2001).

O género *Ralstonia* apresenta o dobro da abundância em FG, 1,66%. Este género compreende algumas espécies que degradam microcistinas (MCs), toxinas intracelulares (Manheim et al., 2019). O holobionte, constituído por animais aquáticos e pelo seu microbioma intestinal, pode influenciar a resistência do hospedeiro ao stress tóxico, influenciando toda a população bacteriana, para além do seu potencial para aumentar a tolerância do hospedeiro aos MCs por si só. A fim de ajudar o hospedeiro a adaptar-se mais eficazmente à toxicidade ambiental, é, portanto, provável que estas modificações na interação entre o género *Ralstonia* e o hospedeiro, se destinem a aumentar a estabilidade da estrutura geral da comunidade intestinal (H. Liu & Yang, 2023). Em relação ao género *Serratia*, que se apresenta quase inexistente em SG, demonstra uma abundância de 0,95% em FG. Responsável pela produção de metabolitos que são importantes para resistir à invasão por parte de microrganismos estranhos (Y. Yang et al., 2022), este género apresenta uma atividade biológica útil na adaptação do hospedeiro num ambiente em mudança (D'Alessio et al., 2000).

No filo Bacteroidota, observam-se 3 géneros “benéficos” mais abundantes em FG. Com uma abundância de 2,61%, o género *Taibaiella* tem a capacidade de reduzir nitrato em nitrito (L. Zhang et al., 2013). Encontrada em solos contaminados com petróleo (Diallo et al., 2021), indica tolerância a xenobióticos, se não a capacidade de degradá-los. Quanto ao género *Prevotella*9, apresenta uma diferença de 0,09% entre os perfis, relativamente maior em FG, com 0,95%. Considerado um produtor de AGCCs, induz um ambiente ácido no lúmen intestinal, que pode inibir o crescimento de vários agentes patogénicos (Lian et al., 2023). Apesar da escassa informação acerca das suas características funcionais no microbioma intestinal em espécies piscícolas, (Surono et al., 2021) correlacionaram positivamente a abundância de *Prevotella*9 com a altura e o peso no Homem. A abundância desta espécie correlaciona-se com a ingestão de fibras alimentares, fermentadas por ação de AGCCs, resultando num aporte de energia para o hospedeiro (G. D. Wu et al., 2011).

O género *Bacteroides* apresenta uma abundância próxima entre os perfis, ligeiramente superior em FG, representando 1,43% dos géneros identificados neste

perfil. Produtor de AGCCs, este género fornece nutrientes e energia necessários ao hospedeiro (De Filippo et al., 2010), através de metabolitos benéficos resultantes da celulólise, facilita os processos digestivo e de absorção (Xu et al., 2024). Relativamente aos seus benefícios gastrointestinais, foi também demonstrado por (X. Chen et al., 2021; Nakajima et al., 2020) que o aumento da abundância de *Bacteroides* pode também aumentar os níveis de taurina, um mecanismo potencialmente útil na prevenção de distúrbios metabólicos induzidos pela dieta. Incluído no filo Actinobacteriota destaca-se a presença de *Cutibacterium*, com a abundância relativa de 8,31% em FG, quase o dobro da sua abundância comparativamente a SG. Este género auxilia o ambiente intestinal em relação ao seu desenvolvimento imunológico, com a capacidade para metabolizar o lactato com a consequente produção de propionato (Rocha Martin et al., 2018), o que revela ser uma característica benéfica, podendo evitar a acumulação de lactato e os seus possíveis efeitos prejudiciais como a acidose (Kowlgi & Chhabra, 2015).

De entre os 7 géneros mais abundantes em SG, 2 incluem-se no filo Firmicutes, entre eles: *Anaerococcus*, que regista uma abundância de 0,64%, apresentando-se quase nula em FG. Alguns membros deste género são capazes de fermentar vários hidratos de carbono, mas a maioria é fracamente fermentativa, utilizam aminoácidos como principais fontes de energia e o butirato é o principal metabolito resultante. Atualmente existe informação dúbia e até inconclusiva sobre a sua influência em vertebrados, tendo até sido associada a sua presença em processos infecciosos (Ezaki et al., 2001). O género *Lactobacillus* apresenta a abundância relativa de 1,93% em SG, 0,27% superior a FG. Este género desempenha um papel importante na fermentação de hidratos de carbono e aminoácidos não digeridos em AGCCs, como o butirato, a principal fonte nutritiva requerida pelos enterócitos (Lopetuso et al., 2013). Sabe-se que a atividade enzimática digestiva está positivamente correlacionada com a capacidade digestiva dos peixes (Hakim et al., 2006; Perez-Casanova et al., 2006) o que, em certa medida, aumenta a sua capacidade de obter nutrientes proveniente dos alimentos (Furné et al., 2005). Mais abundante em SG e compreendido no filo Proteobacteria, foi identificado o género *Bradyrhizobium*, 2,78%. Encontra-se frequentemente associado a plantas e no solo, mas recentemente foi encontrado em abundância no intestino de peixes adultos *Arapaima gigas*, comumente conhecido como pirarucu (Palareti et al., 2017). Descrito também em peixes-zebra (*Danio rerio*), O *Bradyrhizobium* é um probiótico capaz promover a biodisponibilização de azoto para o hospedeiro (S. Yang et al., 2022).

No filo Bacteroidota apresentam-se 2 géneros mais abundantes em SG, entre estes: *Prevotella*7, com 5,78%, mais de 1% do que em FG. É provável que este género possa desempenhar um papel importante na resistência à sépsis (Y. Zhou et al., 2023). Alguns estudos indicam que este compreende alguns membros “benéficos”, que podem melhorar o metabolismo da glicose, promovendo o aumento do armazenamento de glicogénio (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). Algumas espécies compreendidas no género *Prevotella* podem ter propriedades benéficas para a saúde, enquanto outras podem estar envolvidas em doenças inflamatórias intestinais. Estudos adicionais são necessários para compreender os seus efeitos no hospedeiro (Y. Zhou et al., 2023). O género *Prevotella*, também foi identificado mais abundante em SG, com 4,93%, não muito distante do valor em FG. Este género destaca-se pela sua capacidade em fermentar fibras, possuindo enzimas chave envolvidas principalmente no metabolismo dos hidratos de carbono e nos mecanismos de transporte de açúcar, entre outras vias metabólicas (G. D. Wu et al., 2011). Além disso, produzem AGCCs, que são benéficos para a saúde intestinal (Dodd et al., 2010). Os membros do género *Prevotella* têm sido associados a efeitos benéficos para a saúde, como a melhoria do metabolismo da glucose e a correlação com uma dieta rica em fibra (Clemente et al., 2015; Martínez et al., 2015), apresentando benefícios para a saúde intestinal.

Incluído no filo Actinobacteriota, identificou-se o género *Bifidobacterium*, 0,15% mais abundante em SG, com 4,93%. Conhecidas como probióticos, as bifidobactérias estão envolvidas em vários processos da modulação imunológica, entre os quais: processos anti-tumorais, anti-patogénicos e anti-inflamatórios. Também tem a capacidade de produzir acetato, que ajuda a proteger o corpo contra infeções enteropatogénicas (Fukuda et al., 2011; J. Luo et al., 2018) e pode auxiliar a função de barreira imunitária da mucosa intestinal, promovendo a produção de muco (Schroeder et al., 2018). Foi demonstrado que este género impede a colonização de agentes patogénicos no intestino, através da produção de bacteriocinas (Macfarlane et al., 2008). O seu papel na prevenção da colonização e reprodução de oocistos no epitélio intestinal, auxilia a função de barreira intestinal, minimizando assim os danos entéricos (P. Chen et al., 2024). Ainda com maior abundância em SG e incluído no filo Spirochaetota, observa-se o género *Treponema*, com 2,57%, cerca de 0,40% superior a FG. Este é um género produtor de quantidades significativas de AGCCs (Ke et al., 2019) e está normalmente associado à capacidade de decompor as fibras alimentares (Kawasaki et al., 2020).

De entre os 8 géneros classificados como prejudiciais no microbioma intestinal nos perfis analisados (Gráfico 9), apenas 2 são mais abundantes em FG, enquanto 6 apresentam maior abundância em SG. Dos géneros com maior abundância em FG, observa-se *Mycobacterium*, compreendido no filo Actinobacteriota, apresenta a abundância de 3,09% relativamente a este perfil. Este género é patogénico em peixes (Aro et al., 2014; Z. Luo et al., 2018), em que os indivíduos afetados revelam falta de apetite e reduzida atividade natatória, como demonstrado em peixes-zebra (Swaim et al., 2006). Mais abundante em FG, o género *Fusobacterium*, associado ao filo Fusobacteriota, apresenta uma variação cerca de 0,20% entre os perfis, com 2,61 % em FG. A sua influência na etiologia de doenças gastrointestinais tem merecido mais atenção recentemente, revelando uma associação positiva entre a sua presença em doenças inflamatórias e neoplásicas do trato gastrointestinal (Han, 2015).

Relativamente aos géneros mais abundantes em SG, verifica-se a presença de 2 géneros incluídos no filo Proteobacteria, *Methylobacterium-Methylobacterium*, com 3,43%, quase o dobro da sua abundância em FG. Considerado um patogénico comum capaz de infetar peixes imunocomprometidos (Talamantes et al., 2021). O género *Escherichia-Shigella* apresenta a abundância de 2,36%, mais 0,90% do que em FG. É considerado um agente patogénico pró-inflamatório, secreta lipopolissacáridos (LPS) que podem induzir lesões intestinais agudas (L. Liu et al., 2022). No filo Firmicutes observa-se o género *Staphylococcus*, com 7,07%, sensivelmente o dobro da abundância registada em FG. O seu crescimento excessivo está associado à doença inflamatória intestinal (Yuan et al., 2021). Incluído no mesmo filo, verifica-se a presença de *Streptococcus*, com 3,43% em SG. É um agente patogénico oportunista no intestino, o seu sobrecrecimento leva à infeção no caso de imunidade fraca do hospedeiro e desempenha um papel crucial no desenvolvimento da doença inflamatória intestinal (Heidarian et al., 2017).

Compreendido no filo Actinobacteriota, o género *Corynebacterium* apresenta a abundância de 4,93%, cerca de 2% superior ao valor registado em FG. Potencialmente patogénico no intestino humano e animal (Bernard, 2012; Khamis et al., 2004), o aumento da abundância deste género pode refletir a resposta imunitária do hospedeiro (Dorella, 2004; Rooks et al., 2014). Compreendido no filo anteriormente referido, o género *Lawsonella* apresenta cerca do dobro da abundância em SG, com 0,86%. As informações acerca das propriedades funcionais deste género são inconclusivas, contudo aparenta ser patogénico oportunista, descrito numa série de

casos, envolvido em processos inflamatórios e infecciosos em diferentes epitélios (Gonzales Zamora et al., 2020).

Com base na seleção das 35 espécies mais abundantes, comuns aos perfis em análise (Gráfico 10), foi calculada a sua diferença quantitativa entre FG e SG. A este nível taxonômico existem padrões bacterianos que diferem entre os perfis. Estas diferenças foram posteriormente analisadas em função das características funcionais das espécies em questão, baseando-se nas descrições científicas mais atualizadas. Classificaram-se em duas categorias, entre as quais: “espécies benéficas” e “espécies prejudiciais” no microbioma intestinal, (Gráfico 11) e (Gráfico 12), respetivamente.

De entre as 7 espécies bacterianas classificadas como benéficas (Gráfico 11), todas apresentam maior abundância em FG, entre elas, 2 pertencem ao filo Bacteroidota. Incluída no filo anteriormente mencionado, a espécie *Taibaiella* sp. representa 16,13% das espécies identificadas em FG, uma diferença significativa em comparação com uma abundância em SG, 11,76%. Esta espécie tem a capacidade de reduzir nitrato em nitrito (L. Zhang et al., 2013). Encontrada em solos contaminados com petróleo (Diallo et al., 2021), indica tolerância a xenobióticos, se não a capacidade de degradá-los. A espécie *Bacteroides plebeius* representa em FG 1,61% das espécies detetadas neste perfil, enquanto a sua abundância em SG é praticamente nula. Segundo (Shivaji et al., 2021), *B. plebeius* é uma bactéria anti-inflamatória, que aumenta a rigidez da mucosa intestinal e restaura parcialmente a barreira da mucosa. Ao manter a homeostasia da microbiota intestinal, restaura a função da barreira intestinal e reduz a produção de metabolitos derivados da microbiota circulante, o que resulta no alívio do estado inflamatório do organismo mitigando a atrofia músculo-esquelética causada pelo estado inflamatório (Pei et al., 2022).

Observam-se no filo Firmicutes 3 espécies, 2 incluídas no género *Blautia*, entre elas, a espécie *B. obeum* que apresenta a abundância de 3,23% em FG, mais do dobro do que em SG. A espécie *B. faecis* apresenta em ambos os perfis a mesma abundância que a espécie *Bacteroides plebeius*. Relativamente à *B. obeum*, é responsável pela produção de butirato, um modulador reconhecido da função cerebral (Serra et al., 2018). O aumento dos níveis desta espécie no intestino tem sido associado à redução de inflamação (Bajaj et al., 2012), devido às suas propriedades anti-inflamatórias. Existe a evidência que também possa possuir propriedades antibióticas ((X. Liu et al., 2021), no entanto é necessário aprofundar a sua veracidade em teleósteos. Quanto à espécie *B. faecis*, também produtora de butirato, é descrita

como probiótica em indivíduos com doença de Crohn, no entanto são necessários mais estudos para compreender amplitude da sua influência (Takahashi et al., 2016).

Ainda se inclui no filo Firmicutes a espécie *Dorea formicigenerans*, que demonstra nos 2 perfis a mesma abundância que as espécies *B. plebeius* e *B. faecis*. Produtora de quantidades abundantes de ácido fórmico a partir da fermentação de hidratos de carbono (Taras et al., 2015), *D. formicigenerans* é responsável pela produção de ácido fórmico, que aumenta os níveis de microrganismos benéficos e suprime os membros patogénicos a nível intestinal, por exemplo: *E. coli enterotoxigénica* e *Salmonella* spp. (Luise et al., 2020; Ren et al., 2020). A espécie *Akkermansia muciniphila*, que pertence ao filo Verrucomicrobiota, apresenta uma abundância de 3,23%, mais do triplo do que em SG. É descrita como um novo microrganismo funcional com propriedades probióticas, devido à sua capacidade de melhorar as respostas imunitárias e as funções metabólicas do hospedeiro (Gómez-Gallego et al., 2016). Degrada a mucina e habita a camada de muco intestinal (Derrien et al., 2004), como bactérias fermentativas, o seu metabolismo pode produzir grandes quantidades de AGCCs (principalmente acetato e propionato) associados a um aumento da capacidade de recolha de energia por parte do hospedeiro (Lukovac et al., 2014). Podem ter um papel coadjuvante na reparação de feridas na mucosa intestinal e induzir a expressão de proteínas de junção estreita, protegendo assim a barreira intestinal e reduzindo a permeabilidade intestinal (Belzer & De Vos, 2012; Derrien et al., 2017). Compreendida no filo Actinobacteriota, a espécie *Cutibacterium granulosum*, apresenta em FG e SG a mesma abundância que as espécies *B. plebeius*, *B. faecis* e *D. formicigenerans*. O seu principal metabolito final é o propionato, um AGCC essencial na absorção intestinal (Wei et al., 2022).

Das 13 espécies identificadas, comuns aos perfis em análise, que revelam mecanismos de ação prejudiciais no microbioma intestinal (Gráfico 12), observam-se em maior abundância no perfil FG, 3 espécies incluídas no filo Bacteroidota, entre as quais: *Porphyromonas endodontalis* com 8,06%, *Prevotella melaninogenica* com 3,23% e *Tannerella forsythia* com 1,61%. Quanto à espécie *P. endodontalis*, contribui para a destruição do tecido ósseo, através da libertação de fatores de virulência, incluindo LPS, lípidos biologicamente ativos com a capacidade de promover respostas secretoras pró-inflamatórias (Hosoya & Matsushima, 1997; Tang et al., 2011). Além de comprometer a osteoclastogénese, esta espécie tem a capacidade de inibir a função dos osteoblastos (Christopher S. Mirucki, 2014). No entanto é necessário recorrer a futuras investigações que permitam esclarecer especificamente quais os lípidos

secretados por *P. endodontalis* que produzem efeitos deletérios mais significativos nos tecidos do hospedeiro.

Relativamente à espécie *P. melaninogenica*, tem sido associada a processos oncogénicos (Chocolatewala et al., 2010; Mager et al., 2005) e inflamatórios, com maior incidência no tecido ósseo (Lewy et al., 2019). A espécie *T. forsythia* produz toxinas que ativam a resposta inflamatória local e levam à síntese e secreção de vários mediadores inflamatórios (citocinas) que aumentam a atividade das collagenases tecidulares, resultando na destruição do tecido ósseo circundante (Newman & Carranza, 2006). Geralmente encontrados na cavidade oral, são facilmente transferidos para o intestino através da deglutição, influenciando assim alterações substanciais no microbioma intestinal (Koren et al., 2011). Também em maior abundância neste perfil, é observada a espécie *Treponema lecithinolyticum* que se inclui no filo Spirochaetes, com uma abundância de 1,61%. Associada a infeções, esta espécie é um estimulador da expressão de várias citocinas (Jun et al., 2007; Lee et al., 2005). A espécie *Corynebacterium matruchotii*, que pertence ao filo Actinobacteriota, apresenta a mesma abundância que *T. lecithinolyticum* relativamente aos 2 perfis. Apesar da escassa informação em relação às suas propriedades, esta espécie bacteriana está descrita em processos inflamatórios, como a queratite bacteriana (Wilhelmus et al., 1979). Ainda em maior abundância em FG com 1,61%, observa-se a espécie *Campylobacter concisus*, compreendida no filo *Campylobacterota*, cuja abundância em SG é praticamente nula. Considerada uma espécie patogénica oportunista, demonstra patogenicidade apenas quando o ambiente circundante é adequado (Mahendran et al., 2016). As suas capacidades patogénicas, tais como, a indução de apoptose, a invasão epitelial e a produção de citocinas (Man et al., 2010), são fatores patogénicos plausíveis da importância de *C. concisus* em ambientes disbióticos. Indivíduos com afeção inflamatória intestinal apresentam uma prevalência significativamente mais elevada de *C. concisus*, detetada nos seus tecidos intestinais em comparação com controlos saudáveis (L. Zhang et al., 2014). A sua capacidade em aumentar a permeabilidade intestinal, enfraquece a barreira epitelial intestinal, que quando comprometida pode levar à perda de tolerância por parte da microbiota entérica comensal (Nielsen et al., 2011).

Mais abundantes em SG, evidenciam-se 4 espécies incluídas no filo Bacteroidota, assim como no género *Prevotella*. Entre estas, observa-se a presença de *P. nigrescens* com 14,71%, uma espécie que apresenta capacidades patogénicas (Corrêa et al., 2016), através da sobreprodução de proteínas de sinalização celular,

responsáveis por mediar respostas imunitárias e inflamatórias como as citocinas (S.S.Socransky et al., 2014). A espécie *P. denticola* com 11,76% em SG, é frequentemente isolada de processos infecciosos em tecidos moles e tecido ósseo (Ling & Hirase, 2022). Pode contribuir significativamente para a infecção e inflamação em indivíduos imunocomprometidos, podendo estar mais envolvidas em infecções fora da cavidade oral do que se pensava anteriormente (Sherrard et al., 2013). Com 8,82% em FG, a espécie *P. oris* é um agente comum na etiologia de infecções dos tecidos moles, capaz de exacerbar lesões em áreas previamente infetadas, fixando-se a outras células que não as células epiteliais (Cahalan et al., 2013; Goyal et al., 2012).

Relativamente à espécie *P. pleuritidis*, é observada em SG com 5,88% de abundância. Envolvida em processos infecciosos, como abscessos, não apresenta tropismo quanto à sua afeção no organismo, aparentemente revela ser ubíqua nos tecidos ou sistemas que coloniza (Jayasimhan et al., 2017). Mais abundantes em SG, verificam-se ainda 3 espécies incluídas no filo Firmicutes, entre as quais: *Lactobacillus iners*, com 4,41%, *Dialister pneumosintes*, com 2,94% e *Streptococcus dysgalactiae*, também com 2,94%, sendo que sua abundância é praticamente nula em FG. Em relação à espécie *L. iners*, é comum em infecções, dependendo do ambiente e de condições adequadas (Rocca et al., 2018; Rossi et al., 2019). A presença de deinerolisina, uma citotoxina sintetizada por *L. iners*, reforça a ideia de que este microrganismo não apresenta benefícios para o microbioma intestinal, apesar da literatura disponível ser insuficiente para o classificar na sua plenitude (Ferris et al., 2007). Quanto à espécie *D. pneumosintes*, é capaz de causar infecção através da via hematogéna, resultando em infecções do tecido ósseo e de tecidos moles. Pode também desempenhar um papel fundamental na carcinogénese gástrica (Coker et al., 2018). Descrita como patogénica, a espécie *S. dysgalactiae* é responsável por afeções tanto no Homem como em peixes (Abdelsalam et al., 2013), no entanto são necessários mais estudos que descrevam a sua patogenicidade a nível gastrointestinal.

Através da análise da abundância relativa, dos membros que constituem as categorias taxonómicas analisadas, foi possível interpretar e dar resposta a algumas questões centrais, que motivaram o delineamento deste estudo. Quando discriminada a abundância dos 100 géneros predominantes, comuns aos 2 perfis em análise, é possível verificar que em FG estes dados representam 56,94%, do total identificado a este nível taxonómico, comparativamente à sua abundância em SG, 60,8%. De entre os 35 principais géneros identificados em FG, observa-se que estes representam

42,1%, enquanto em SG estes resultados compreendem 46,7% do total identificado. Quanto à análise da abundância referente aos 35 principais membros da categoria taxonómica espécie, verifica-se que esta representa 6,2% do total identificado em FG, inferior à abundância registada em SG, 6,8%. É possível compreender através destes resultados, que FG apresenta uma maior diversidade bacteriana em comparação com SG.

A compreensão das propriedades funcionais por categoria taxonómica (género e espécie), em relação aos mecanismos “benéficos” no microbioma, revela que quer a nível do género quer a nível da espécie, o perfil FG (15 géneros / 7 espécies) apresenta um maior número de membros envolvidos em maior abundância comparativamente a SG (7 géneros / 0 espécies). Entre os mecanismos de ação considerados benéficos destacam-se as propriedades probióticas e pré-bióticas, a atividade antibacteriana e a digestão de hidratos de carbono e aminoácidos não digeridos em AGCCs, como o butirato, propionato e acetato (fontes de energia biodisponíveis para o hospedeiro). A produção de enzimas amilase, lipase, celulase, quitinase e protease, responsáveis pela digestão de hidratos de carbono e proteína. A indução da expressão de proteínas de junção estreita, que protegem a barreira intestinal e reduzem a permeabilidade intestinal. Algumas propriedades anti-inflamatórias que aumentam a rigidez da mucosa intestinal e causam supressão de agentes patogénicos. A degradação de toxinas intracelulares, xenobióticos, microplásticos e poluentes ambientais.

Relativamente à abundância dos microrganismos com mecanismos “prejudiciais” no microbioma intestinal, observa-se um maior número de membros nas categorias taxonómicas género e espécie em SG (6 géneros / 7 espécies), comparativamente a FG (2 géneros / 6 espécies). Entre os principais mecanismos que afetam a homeostasia e desenvolvimento do indivíduo, é de destacar o aumento da permeabilidade intestinal que enfraquece a barreira epitelial intestinal. A libertação de fatores de virulência como LPS e citocinas, que promovem respostas pró-inflamatórias. Afeções do tecido ósseo e de tecidos moles, que causam deficiências no crescimento e perda de condição corporal. Comparar a abundância relativa dos membros taxonómicos, comuns aos perfis em análise, não fornece resultados suficientemente esclarecedores em termos da sua compreensão biológica. O mapa de calor (Gráfico 7 e Gráfico 10) tem em consideração esse fator, e permite uma comparação entre perfis, considerando a abundância média relativa dos membros referentes à categoria taxonómica analisada além do desvio padrão de cada um destes em cada perfil, ou

seja, considera os peixes de cada perfil que apresentam valores abaixo ou acima da média do grupo. Permitindo uma análise mais aproximada dos indivíduos que partilham as mesmas características assim como as diferenças entre eles.

As maiores diferenças entre os perfis analisados, ao nível do género, destacam em FG: 8 géneros “benéficos” (*Lactococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium hallii* group, *Serratia*, *Cutibacterium*, *Allbaculum*, *Ralstonia* e *Subdoligranulum*) e 0 géneros “prejudiciais”, comparativamente, em SG: 6 géneros “benéficos” (*Lactobacillus*, *Anaerococcus*, *Prevotella*⁷, *Bradyrhizobium*, *Bifidobacterium* e *Treponema*) e 5 géneros “prejudiciais” (*Escherichia-Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Methylobacterium-Methylobacterium*). Ao nível da espécie, FG apresenta: 3 espécies “benéficas” (*Cutibacterium granulosum*, *Dorea formicigenerans* e *Akkermansia muciniphila*) e 1 espécie “prejudicial” (*Treponema lecithinolyticum*), enquanto, em SG registam-se: 0 espécies “benéficas” e 5 espécies “prejudiciais” (*Lactobacillus iners*, *Dialister pneumosintes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Prevotella denticola*, *Tanarella forsythia*).

Apesar de ser possível compreender que FG possui mais membros entre diferentes categorias taxonómicas, responsáveis por promover a saúde e crescimento do que SG, e que existe uma dominância em SG relativamente aos agentes bacterianos com propriedades prejudiciais no microbioma intestinal, não é possível compreender qual a influência da sua abundância em termos funcionais, assim como de interpretar quais as características centrais que mediaram o desenvolvimento de perfis de crescimento díspares a partir de peixes morfologicamente semelhantes. A ideia de um microbioma intestinal central tem sido investigada sobretudo em modelos humanos e animais (Turnbaugh & Gordon, 2009), mas muitos autores defendem que os peixes teleósteos estão sujeitos à mesma ideia. Descobrir o microbioma central partilhado dos peixes é provavelmente mais difícil do que em mamíferos, devido à vasta gama de espécies filogeneticamente diversas entre os teleósteos. Ainda não se sabe se todas as espécies de peixes têm um microbioma central e a que nível filogenético (Wilson et al., 2008).

V Conclusão

A investigação científica em aquacultura preenche as lacunas do seu conhecimento diariamente, tendo por base estudos com evidência científica, isto é, que discriminem todas as características inerentes aos métodos experimentais assim como o material biológico envolvido. Atualmente são inúmeras as questões envolvidas nos processos de bem-estar e desenvolvimento das espécies produzidas por este setor. Quanto à questão dogmática “será a performance de crescimento o fator etiológico das características do microbioma intestinal ou vice-versa”, permanece ainda em aberto. Embora não seja possível ter resposta à totalidade das questões propostas que motivaram este estudo, foram identificados alguns padrões, com base nas características funcionais dos membros bacterianos compreendidos em vários níveis taxonômicos. Nesta linha de raciocínio, os resultados provenientes deste estudo apoiam a hipótese de que a performance de crescimento, a qualidade e a quantidade bacteriana, presentes no microbioma intestinal, estão intimamente relacionadas. A falta de referências quanto à influência da abundância relativa na normobiose ou disbiose, associadas ao microbioma intestinal, dificulta a interpretação de todas as questões requeridas. São necessárias mais investigações que correlacionem a espécie em estudo com abundância e qualidade dos membros bacterianos identificados, mas acima de tudo, que garantam que as variáveis envolvidas no delineamento de cada estudo posterior, sejam bem discriminadas, permitindo a outros investigadores reproduzir a metodologia semelhantemente e obter mais background sobre este tema.

VI Referências bibliográficas

- Abdelsalam, M., Asheg, A., & Eissa, A. E. (2013). *Streptococcus dysgalactiae*: An emerging pathogen of fishes and mammals. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.04.002>
- Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems*. 2017; 2(2):e00191-16. Publicado em 7 de março de 2017. DOI:10.1128/mSystems.00191-16.
- Aro, L., Correa, K., Martínez, A., Ildefonso, R., & Yáñez, J. M. (2014). Characterization of *Mycobacterium salmoniphilum* as causal agent of mycobacteriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from a freshwater recirculation system. *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 341–348. <https://doi.org/10.1111/jfd.12108>
- Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *TheScientificWorldJournal*, 6, 931–945. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.181>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bajaj, J. S., Hylemon, P. B., Ridlon, J. M., Heuman, D. M., Daita, K., White, M. B., Monteith, P., Noble, N. A., Sikaroodi, M., & Gillevet, P. M. (2012). Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(6), 675–685. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00152.2012>
- Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E., & Krogdahl, Å. (2007). Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 97(4), 699–713. <https://doi.org/10.1017/S0007114507381397>
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 72(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0441-8>
- Barata, M., Soares, F., Aragão, C., Almeida, A. C., Pousão-Ferreira, P., & Ribeiro, L. (2016). Efficiency of 2-phenoxyethanol and Clove Oil for Reducing Handling Stress in Reared Meagre, *Argyrosomus regius* (Pisces: Sciaenidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 82–92. <https://doi.org/10.1111/jwas.12245>
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297(2), 374–386. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.006>
- Belzer, C., & De Vos, W. M. (2012). Microbes inside from diversity to function: The case of *Akkermansia*. *ISME Journal*, 6(8), 1449–1458. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6>
- Bernard, K. (2012). The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3152–3158. <https://doi.org/10.1128/JCM.00796-12>

- Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, et al. Otimizando a classificação taxonômica de sequências amplicon de marcadores genéticos com o plug-in q2-feature-classifier do QIIME 2. *Microbioma*. 2018; 6(1):90. Publicado em 17 de maio de 2018. DOI:10.1186/s40168-018-0470-z.
- Bolnick, D. I., Snowberg, L. K., Hirsch, P. E., Lauber, C. L., Knight, R., Caporaso, J. G., & Svanbäck, R. (2014). Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch). *Ecology Letters*, 17(8), 979–987. <https://doi.org/10.1111/ele.12301>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Ciência de dados de microbioma reprodutível, interativa, escalável e extensível usando QIIME 2 [correção publicada aparece em *Nat Biotechnol*. 2019 Sep; 37(9):1091]. *Nat Biotechnol*. 2019; 37(8):852-857. DOI:10.1038/s41587-019-0209-9.
- Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J., & Ratan, R. R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience Letters*, 625, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.009>
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JAN), 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: Inferência de amostra de alta resolução a partir de dados do amplificador Illumina. *NatMethods*. 2016; 13(7):581-583. DOI:10.1038/nmeth.3869.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Variantes de sequência exata devem substituir unidades taxonômicas operacionais na análise de dados de marcadores genéticos. *ISME J*. 2017; 11(12):2639-2643. DOI:10.1038/ismej.2017.119.
- Cahalan, S. D., Hick, G., Rossiter, A., & Callanan, J. J. (2013). Fatal *Prevotella oralis* meningitis. *Journal of Small Animal Practice*, 54(3), 153–155. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01311.x>
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Padrões globais de diversidade de rRNA 16S a uma profundidade de milhões de sequências por amostra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 Suppl 1 (Suppl 1): 4516-4522. DOI:10.1073/pnas.1000080107.
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2247–2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chen, P., Li, S., Zheng, L., Wang, Z., He, Y., Liu, K., Li, M., Wang, Y., Shaukat, A., Li, S., Huang, S., & Jian, F. (2024). Effects of *Radix dichroae* extract supplementation on growth performance, oocysts output and gut microbiota in growing lambs with coccidiosis. *Veterinary Research Communications*, 48(1), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10209-8>
- Chen, X., Gao, C., Du, X., Xu, H., Wang, G., & Zhang, D. (2021). Effects of dietary γ -aminobutyric acid levels on the growth, serum biochemical indexes, immune-related signalling molecules of Jian carp. *Aquaculture Research*, 52(3), 1096–1105. <https://doi.org/10.1111/are.14965>
- Chocolatewala, N., Chaturvedi, P., & Desale, R. (2010). The role of bacteria in oral cancer. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 31(4), 126–131. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.76195>

- Christopher S. Mirucki. (2014). Biologic Activity of *Porphyromonas endodontalis* complex lipids. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.017>. Biologic
- Cicala, F., Lago-Lestón, A., Gomez-Gil, B., Gollas-Galván, T., Chong-Robles, J., Cortés-Jacinto, E., & Martínez-Porchas, M. (2020). Gut microbiota shifts in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, during the postlarvae, juvenile, and adult stages. *Aquaculture International*, 28(4), 1421–1433. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00532-1>
- Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., Magris, M., Hidalgo, G., Contreras, M., Noya-Alarcón, Ó., Lander, O., McDonald, J., Cox, M., Walter, J., Oh, P. L., Ruiz, J. F., Rodriguez, S., Shen, N., Song, S. J., ... Dominguez-Bello, M. G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances*, 1(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
- Clements, K. D., Pasch, I. B. Y., Moran, D., & Turner, S. J. (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Marine Biology*, 150(6), 1431–1440. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0443-9>
- Coker, O. O., Dai, Z., Nie, Y., Zhao, G., Cao, L., Nakatsu, G., Wu, W. K., Wong, S. H., Chen, Z., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2018). Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut*, 67(6), 1024–1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314281>
- Corrêa, J. D., Saraiva, A. M., Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F. M., Duarte, P. M., Teixeira, M. M., Souza, D. G., & da Silva, T. A. (2016). Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. *Anaerobe*, 39, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.03.006>
- D'Alessio, R., Bargiotti, A., Carlini, O., Colotta, F., Ferrari, M., Gnocchi, P., Isetta, A., Mongelli, N., Motta, P., Rossi, A., Rossi, M., Tibolla, M., & Vanotti, E. (2000). Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(13), 2557–2565. <https://doi.org/10.1021/jm001003p>
- Dawood, M. A. O., Metwally, A. E. S., El-Sharawy, M. E., Atta, A. M., Elbially, Z. I., Abdel-Latif, H. M. R., & Paray, B. A. (2020). The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture*, 523(January), 735205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>
- Del'Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C. G., & Abreu, P. C. (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388–391(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>
- Derrien, M., Belzer, C., & de Vos, W. M. (2017). Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*, 106, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia

- municiphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.02873-0>
- Dhanasiri, A. K. S., Brunvold, L., Brinchmann, M. F., Korsnes, K., Bergh, Ø., & Kiron, V. (2011). Changes in the Intestinal Microbiota of Wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. Upon Captive Rearing. *Microbial Ecology*, 61(1), 20–30. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9673-y>
- Diallo, M. M., Vural, C., Cay, H., & Ozdemir, G. (2021). Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 130, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/jam.14848>
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D., & Davies, S. J. (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production - A Mediterranean perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.009>
- Dodd, D., Moon, Y. H., Swaminathan, K., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2010). Transcriptomic analyses of xylan degradation by *Prevotella bryantii* and insights into energy acquisition by xylanolytic bacteroidetes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30261–30273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141788>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Dorella. (2004). *Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence*. 35, 467–483. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Engels, C., Ruscheweyh, H. J., Beerenwinkel, N., Lacroix, C., & Schwab, C. (2016). The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00713>
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G., Martínez-Llorens, S., & Moreau, C. S. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS ONE*, 10(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136389>
- Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z. Y., Zhao, L., & Shu, S. E. (2001). Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1521–1528. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1521>
- FAO, T. H. E. S. (2022). In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. In *Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. <https://doi.org/10.4060/cc0463en>
- Ferris, M. J., Norori, J., Zozaya-Hinchliffe, M., & Martin, D. H. (2007). Cultivation-independent

- analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 1016–1018. <https://doi.org/10.1128/JCM.02085-06>
- Fessard, A., & Remize, F. (2017). Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? *Fermentation*, 3(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation3030038>
- Fjellheim, A. J., Playfoot, K. J., Skjermo, J., & Vadstein, O. (2012). Inter-individual variation in the dominant intestinal microbiota of reared Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Research*, 43(10), 1499–1508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02952.x>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute. *Gut Microbes*, August, 289–306.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–549. <https://doi.org/10.1038/nature09646>
- Furné, M., Hidalgo, M. C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezainé, J., & Sanz, A. (2005). Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 250(1–2), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.017>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- GIBBONS, N. E. (1933). the Slime and Intestinal Flora of Some Marine Fishes. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries*, 8(1), 275–290. <https://doi.org/10.1139/f33-022>
- Givens, C. E., Ransom, B., Bano, N., & Hollibaugh, J. T. (2015). Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518, 209–223. <https://doi.org/10.3354/meps11034>
- Gómez-Gallego, C., Pohl, S., Salminen, S., De Vos, W. M., & Kneifel, W. (2016). *Akkermansia muciniphila*: A novel functional microbe with probiotic properties. *Beneficial Microbes*, 7(4), 571–584. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0009>
- Gonzales Zamora, J. A., Romero Alvarez, M., Henry, Z., Baracco, G. J., Dickinson, G., & Lichtenberger, P. (2020). Liver abscess caused by *Lawsonella clevelandensis* in a patient with rheumatoid arthritis: A case report and literature review. *IDCases*, 20, e00734. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00734>
- Goyal, H., Arora, S., Mishra, S., Jamil, S., & Shah, U. (2012). Vertebral osteomyelitis and epidural abscesses caused by *Prevotella oralis*: A case report. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(6), 594–596. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.008>
- Greetham, H. L., Gibson, G. R., Giffard, C., Hippe, H., Merkhoffer, B., Steiner, U., Falsen, E., & Collins, M. D. (2004). *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from

- canine feces. *Anaerobe*, 10(5), 301–307.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.06.004>
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., & Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 155(1–4), 387–399. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00113-0)
- Hakim, Y., Uni, Z., Hulata, G., & Harpaz, S. (2006). Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. *Aquaculture*, 257(1–4), 420–428.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.034>
- Hamre, J., Johnsen, E., & Hamre, K. (2014). A new model for simulating growth in fish. *PeerJ*, 2014(1), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.244>
- Han, Y. W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.013>
- Hao, W. L., & Lee, Y. K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 268(3), 491–502. <https://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:491>
- Heidarian, F., Noormohammadi, Z., Asadzadeh Aghdaei, H., & Alebouyeh, M. (2017). Relative abundance of *Streptococcus* spp. and its association with disease activity in inflammatory bowel disease patients compared with controls. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 12(2). <https://doi.org/10.5812/archcid.57291>
- Henriksson, P. J. G., Troell, M., Banks, L. K., Belton, B., Beveridge, M. C. M., Klinger, D. H., Pelletier, N., Phillips, M. J., & Tran, N. (2021). Interventions for improving the productivity and environmental performance of global aquaculture for future food security. *One Earth*, 4(9), 1220–1232. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.009>
- Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Descoberta metagenômica de genes degradadores de biomassa e genomas de rúmen de vaca. *Ciência*. 2011; 331(6016):463-467.
 DOI:10.1126/science.1200387.
- Holscher, H. D. (2017). Dietary Fiber and Prebiotics and the Gastrointestinal Microbiota
 Hannah D . Holscher , PhD , RD Assistant Professor of Nutrition and Human Microbiome * Department of Food Science and Human Nutrition and Division of Nutritional Sciences , University of Ill. *Gut Microbes*, 1–23.
- Hosoya, S., & Matsushima, K. (1997). Stimulation of interleukin-1 β production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*, 23(1), 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80205-1](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80205-1)
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G., & Pieterse, C. M. J. (2018). How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Frontiers in Nutrition*, 5(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090>
- Ingerslev, H. C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., & Madsen, L. (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, 424–425, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

- Jayasimhan, D., Wu, L., & Huggan, P. (2017). Fusobacterial liver abscess: A case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2548-9>
- Jennings, S., Stentiford, G. D., Leocadio, A. M., Jeffery, K. R., Metcalfe, J. D., Katsiadaki, I., Auchterlonie, N. A., Mangi, S. C., Pinnegar, J. K., Ellis, T., Peeler, E. J., Luisetti, T., Baker-Austin, C., Brown, M., Catchpole, T. L., Clyne, F. J., Dye, S. R., Edmonds, N. J., Hyder, K., ... Verner-Jeffreys, D. W. (2016). Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. *Fish and Fisheries*, 17(4), 893–938. <https://doi.org/10.1111/faf.12152>
- Jing, Y., Yang, D., Bai, F., Wang, Q., Zhang, C., Yan, Y., Li, Z., Li, Y., Chen, Z., Li, J., & Yu, Y. (2023). Spinal cord injury-induced gut dysbiosis influences neurological recovery partly through short-chain fatty acids. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00466-5>
- Jun, H. K., Lee, H. R., Lee, S. H., & Choi, B. K. (2007). Mapping of the proinflammatory domains of MspTL of *Treponema lecithinolyticum*. *Microbiology*, 153(8), 2386–2392. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006650-0>
- Kapatral, V., Ivanova, N., Anderson, I., Reznik, G., Bhattacharyya, A., Gardner, W. L., Mikhailova, N., Lapidus, A., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Haselkorn, R., Overbeek, R., & Kyrpides, N. (2003). Genome analysis of *F. nucleatum* sub spp *vincentii* and its comparison with the genome of *F. nucleatum* ATCC 25586. *Genome Research*, 13(6 A), 1180–1189. <https://doi.org/10.1101/gr.566003>
- Kawasaki, K., Ohya, K., Omatsu, T., Katayama, Y., Takashima, Y., Kinoshita, T., Odoi, J. O., Sawai, K., Fukushima, H., Ogawa, H., Inoue-Murayama, M., Mizutani, T., Adenyo, C., Matsumoto, Y., & Kayang, B. (2020). Comparative analysis of fecal microbiota in grasscutter (*Thryonomys swinderianus*) and other herbivorous livestock in Ghana. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020265>
- Ke, S., Fang, S., He, M., Huang, X., Yang, H., Yang, B., Chen, C., & Huang, L. (2019). Age-based dynamic changes of phylogenetic composition and interaction networks of health pig gut microbiome feeding in a uniformed condition. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1918-5>
- Khamis, A., Raoult, D., & La Scola, B. (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3925–3931. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004>
- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1654–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>
- Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C. J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R. E., & Bäckhed, F. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4592–4598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y. S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., & Bäckhed, F. (2015). Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism*, 22(6), 971–982. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>
- Kowlgi, N. G., & Chhabra, L. (2015). D-lactic acidosis: An underrecognized complication of

- short bowel syndrome. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/476215>
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7(September 2014), 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Lan, C.-C., & Love, D. R. (2012). Molecular Characterisation of Bacterial Community Structure along the Intestinal Tract of Zebrafish (*Danio rerio*): A Pilot Study . *ISRN Microbiology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/590385>
- Larsen, A. M. . (2014). *Studies on the Microbiota of Fishes and the Factors Influencing Their Composition*. 255.
- Larsen, A. M., Mohammed, H. H., & Arias, C. R. (2014). Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6), 1396–1404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>
- Larsen, A. M., Mohammed, H. H., & Arias, C. R. (2015). Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes. *FEMS Microbiology Letters*, 362(5), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu031>
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A., & Arias, C. R. (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 483–494. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12136>
- Lee, S. H., Kim, K. K., & Choi, B. K. (2005). Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associated with periodontitis and endodontic . *Infection and Immunity*, 73(1), 268–276. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.268-276.2005>
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G., & Oxley, A. P. A. (2018). The inner workings of the outer surface: Skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664>
- Length, F. (2023). *Inoculation of wheat with*. 10(3), 464–471.
- Lewy, T., Hong, B. Y., Weiser, B., Burger, H., Tremain, A., Weinstock, G., Anastos, K., & George, M. D. (2019). Oral Microbiome in HIV-Infected Women: Shifts in the Abundance of Pathogenic and Beneficial Bacteria Are Associated with Aging, HIV Load, CD4 Count, and Antiretroviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 35(3), 276–286. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0200>
- Li M, Shao D, Zhou J, et al. Assinaturas dentro da microbiota esofágica com progressão do carcinoma epidermóide esofágico. *Jornal Chinês de Pesquisa do Câncer*. 2020; 32(6):755-767. DOI:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.09.
- Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., Zhang, T., Yu, Y., & Yan, Q. (2014). Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1750–1760. <https://doi.org/10.1111/jam.12663>
- Li, X., Zhou, L., Yu, Y., Ni, J., Xu, W., & Yan, Q. (2017). Composition of Gut Microbiota in the Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) Varies with Host Development. *Microbial Ecology*, 74(1), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0924-4>

- Lian, Z., Xu, Y., Wang, C., Chen, Y., Yuan, L., Liu, Z., Liu, Y., He, P., Cai, Z., & Zhao, J. (2023). Gut microbiota-derived melatonin from *Puerariae Lobatae Radix*-resistant starch supplementation attenuates ischemic stroke injury via a positive microbial co-occurrence pattern. *Pharmacological Research*, 190(January), 106714. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106714>
- Lim, M. Y., Song, E. J., Kim, S. H., Lee, J., & Nam, Y. Do. (2018). Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.008>
- Ling, J., & Hirase, T. (2022). Necrotizing Fasciitis Due to *Prevotella denticola* Infection in an Intravenous Drug User. *Cureus*, 14(1), 3–5. <https://doi.org/10.7759/cureus.20901>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6(September 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Liu, H., & Yang, X. (2023). *Gut Microbiota of Freshwater Gastropod (Bellamya aeruginosa)*. 1–17.
- Liu, L., Wang, H., Zhang, H., Chen, X., Zhang, Y., Wu, J., Zhao, L., Wang, D., Pu, J., Ji, P., & Xie, P. (2022). Toward a Deeper Understanding of Gut Microbiome in Depression: The Promise of Clinical Applicability. *Advanced Science*, 9(35), 1–14. <https://doi.org/10.1002/advs.202203707>
- Liu, S., Wang, S., Cai, Y., Li, E., Ren, Z., Wu, Y., Guo, W., Sun, Y., & Zhou, Y. (2020). Beneficial effects of a host gut-derived probiotic, *Bacillus pumilus*, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 514. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734446>
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, 13(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Liu, Y., Chen, Z., Dai, J., Yang, P., Hu, H., Ai, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, Y., & Mai, K. (2018). The protective role of glutamine on enteropathy induced by high dose of soybean meal in turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 497, 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.021>
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>
- Llewellyn, M. S., McGinnity, P., Dionne, M., Letourneau, J., Thonier, F., Carvalho, G. R., Creer, S., & Derome, N. (2016). The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *ISME Journal*, 10(5), 1280–1284. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.189>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., & Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-23>

- Lowrey, L., Woodhams, D. C., Tacchi, L., & Salinas, I. (2015). Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6915–6925. <https://doi.org/10.1128/AEM.01826-15>
- Luise, D., Correa, F., Bosi, P., & Trevisi, P. (2020). A review of the effect of formic acid and its salts on the gastrointestinal microbiota and performance of pigs. *Animals*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ani10050887>
- Lukovac, S., Belzer, C., Pellis, L., Keijser, B. J., de Vos, W. M., Montijn, R. C., & Roeselers, G. (2014). Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. *MBio*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01438-14>. Editor
- Luo, J., Li, Y., Xie, J., Gao, L., Liu, L., Ou, S., Chen, L., & Peng, X. (2018). The primary biological network of *Bifidobacterium* in the gut. *FEMS Microbiology Letters*, 365(8). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny057>
- Luo, Z., Li, J., Zhang, Z., Hao, S., Bai, X., You, H., Mo, Z., & Feng, S. (2018). *Mycobacterium marinum* is the causative agent of splenic and renal granulomas in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China. *Aquaculture*, 490, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.036>
- Ma, J., Zhou, Q., & Li, H. (2017). Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease: Insights on mechanisms and therapy. *Nutrients*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/nu9101124>
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>
- Mager, D. L., Haffajee, A. D., Delvin, P. M., Norris, C. M., Posner, M. R., & Goodson, J. M. (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>
- Mahendran, V., Liu, F., Riordan, S. M., Grimm, M. C., Tanaka, M. M., & Zhang, L. (2016). Examination of the effects of *Campylobacter concisus* zonula occludens toxin on intestinal epithelial cells and macrophages. *Gut Pathogens*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0101-9>
- Man, S. M., Kaakoush, N. O., Leach, S. T., Nahidi, L., Lu, H. K., Norman, J., Day, A. S., Zhang, L., & Mitchell, H. M. (2010). Host attachment, invasion, and stimulation of proinflammatory cytokines by *Campylobacter concisus* and other non-*Campylobacter jejuni* *Campylobacter* species. *Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1855–1865. <https://doi.org/10.1086/657316>
- Manheim, D., Cheung, Y. M., & Jiang, S. (2019). The effect of organic carbon addition on the community structure and kinetics of Microcystin-Degrading bacterial consortia. *Water (Switzerland)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/w10111523>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Mardis, E. R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470(7333), 198–203. <https://doi.org/10.1038/nature09796>
- Martínez, I., Stegen, J. C., Maldonado-Gómez, M. X., Eren, M. A., Siba, P. M., Greenhill, A. R., & Walter, J. (2015). The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. *Cell Reports*, 11(4), 527–

538. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>

Marx, T. (2015). Immunoprotective Effects of Probiotics in the Elderly. *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*, 363–372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418680-4.00035-X>

Marzec-Grządziel, A., & Gałązka, A. (2023). Sequencing of the Whole Genome of a Bacterium of the Genus *Achromobacter* Reveals Its Potential for Xenobiotics Biodegradation. *Agriculture (Switzerland)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/agriculture13081519>

Mazmanian, S. K., Cui, H. L., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>

Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). Mucosal Health in Aquaculture. In *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2/00010-8>

Miyake, S., Ngugi, D. K., & Stingl, U. (2015). Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Molecular Ecology*, 24(3), 656–672. <https://doi.org/10.1111/mec.13050>

Miyazawa, T., Yukawa, T., Koshiha, T., Ueji, S., Yanagihara, R., & Yamada, T. (2001). Enzymatic resolution of 2-phenoxy-1-propanols through the enantioselective acylation mediated by *Achromobacter* sp. lipase. *Biotechnology Letters*, 23(19), 1547–1550. <https://doi.org/10.1023/A:1011939408925>

Mongile, F., Bonaldo, A., Fontanillas, R., Mariani, L., Badiani, A., Bonvini, E., & Parma, L. (2014). Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1), 30–34. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.2999>

Mylonas, C. C., Zohar, Y., Pankhurst, N., & Kagawa, H. (2011). Reproduction and Broodstock Management. In *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species* (Issue Sheaves 2006). <https://doi.org/10.1002/9781444392210.ch4>

Nakajima, A., Sasaki, T., Itoh, K., Kitahara, T., Takema, Y., Hiramatsu, K., Ishikawa, D., Shibuya, T., Kobayashi, O., Osada, T., Watanabe, S., & Nagahara, A. (2020). A soluble fiber diet increases *Bacteroides fragilis* group abundance and immunoglobulin a production in the gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00405-20>

Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R., & Romero, J. (2012). PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE*, 7(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031335>

Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>

Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world* (fourth edi).

Newman, M. G., & Carranza, F. (2006). Clinical Periodontology 10 Edition. In *Saunders Elsevier*.

Nielsen, H. L., Nielsen, H., Ejlersen, T., Engberg, J., Günzel, D., Zeitz, M., Hering, N. A., Fromm, M., Schulzke, J. D., & Bücker, R. (2011). Oral and fecal *Campylobacter concisus* strains perturb barrier function by apoptosis induction in HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*, 6(8), 2–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023858>

Niu, K. M., Kothari, D., Lee, W. Do, Lim, J. M., Khosravi, S., Lee, S. M., Lee, B. J., Kim, K.

- W., Han, H. S., & Kim, S. K. (2019). Autochthonous *Bacillus licheniformis*: Probiotic potential and survival ability in low-fishmeal extruded pellet aquafeed. *MicrobiologyOpen*, 8(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.767>
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Org, E., Parks, B. W., Joo, J. W. J., Emert, B., Schwartzman, W., Kang, Y., Mehrabian, M., Pan, C., Knight, R., Gunsalus, R., Thomas, A., Eskin, E., & Lusi, A. J. (n.d.). *Org2015*.
- Pabari, K., Pithva, S., Kothari, C., Purama, R. K., Kondepudi, K. K., Vyas, B. R. M., Kothari, R., & Ambalam, P. (2020). Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1126–1138. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09630-w>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosi, A. (2017). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Panek, M., Čipčić Paljetak, H., Barešić, A., Perić, M., Matijašić, M., Lojkić, I., Bender, D. V., Krznarić, Ž., & Verbanac, D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota-Effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23296-4>
- Parma, L., Candela, M., Soverini, M., Turrone, S., Consolandi, C., Brigidi, P., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Gatta, P. P., & Bonaldo, A. (2016). Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.022>
- Pei, T., Zhu, D., Yang, S., Hu, R., Wang, F., Zhang, J., Yan, S., Ju, L., He, Z., Han, Z., He, J., Yan, Y., Wang, M., Xiao, W., & Ma, Y. (2022). *Bacteroides plebeius* improves muscle wasting in chronic kidney disease by modulating the gut-renal muscle axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(24), 6066–6078. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17626>
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition*, 139(9), 1619–1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
- Perez-Casanova, J. C., Murray, H. M., Gallant, J. W., Ross, N. W., Douglas, S. E., & Johnson, S. C. (2006). Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 251(2–4), 377–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.007>
- Piazzon, M. C., Calduch-Giner, J. A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto, M., Karalazos, V., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2017). Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, 5(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0390-3>
- Piazzon, M. C., Naya-Català, F., Perera, E., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2020). Genetic selection for growth drives differences in intestinal

- microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00922-w>
- Piazzon, M. C., Naya-Català, F., Simó-Mirabet, P., Picard-Sánchez, A., Roig, F. J., Caldich-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2019). Sex, age, and bacteria: How the intestinal microbiota is modulated in a protandrous hermaphrodite fish. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02512>
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., & Gordon, J. I. (2006). Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, 127(2), 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043>
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). *Rawls et al. 2004*. 1–6. [papers2://publication/uuid/897C5AC0-1CF8-4439-A8CE-1A42D6A7D552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15811111/)
- REED, G. B., & SPENCE, C. M. (1929). the Intestinal and Slime Flora of the Haddock: a Preliminary Report. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries*, 4(1), 257–264. <https://doi.org/10.1139/f29-019>
- Ren, C., Wang, Y., Lin, X., Song, H., Zhou, Q., Xu, W., Shi, K., Chen, J., Song, J., Chen, F., Zhang, S., & Guan, W. (2020). A Combination of Formic Acid and Monolaurin Attenuates Enterotoxigenic Escherichia coli Induced Intestinal Inflammation in Piglets by Inhibiting the NF- κ B/MAPK Pathways with Modulation of Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(14), 4155–4165. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01414>
- Ringø, E., & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160(3–4), 177–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8)
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogh, Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Rocca, M. F., Aguerre, L., Cipolla, L., Martínez, C., Armitano, R., Dangiolo, G., & Prieto, M. (2018). Lactobacillus spp. invasive infections in Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 163. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3783>
- Rocha Martin, V. N., Schwab, C., Krych, L., Voney, E., Geirnaert, A., Braegger, C., & Lacroix, C. (2018). Colonization of Cutibacterium avidum during infant gut microbiota establishment. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy215>
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., & Rawls, J. F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, 5(10), 1595–1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
- Romero, J., Ringø, E., & Merrifield, D. L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 75–100. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>
- Rooks, M. G., Veiga, P., Wardwell-Scott, L. H., Tickle, T., Segata, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Beal, C., Van Hylckama-Vlieg, J. E. T., Ballal, S. A., Morgan, X. C., Glickman, J. N., Gevers, D., Huttenhower, C., & Garrett, W. S. (2014). Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME Journal*, 8(7), 1403–1417. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.3>
- Rosero, J. A., Killer, J., Sechovcová, H., Mrázek, J., Benada, O., Fliegerová, K., Havlík, J., &

- Kopečný, J. (2016). Reclassification of *Eubacterium rectale* (Hauduroy et al. 1937) prévot 1938 in a new genus *agathobacter* gen. nov. as *Agathobacter rectalis* comb. nov., and description of *Agathobacter ruminis* sp. nov., isolated from the rumen contents of sheep and cows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 768–773. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000788>
- Rosselló-Mora, R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6255–6257. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6255-6257.2005>
- Rossi, F., Amadoro, C., & Colavita, G. (2019). Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: A review. *Microorganisms*, 7(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050126>
- S.S.Socransky, A. D. H., And, M.A.Cuginil, C. S., & Jr., R. L. K. (2014). Microbial complexes in subgingival plaque. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(3), 134–144. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204954>
- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M. A., Olsen, R. E., Meseguer, J., & Ringø, E. (2008). In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology*, 128(1–2), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.011>
- Schroeder, B. O., Birchenough, G. M. H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M. E. V., Hansson, G. C., & Bäckhed, F. (2018). Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host and Microbe*, 23(1), 27–40.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.004>
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R., & Miller, K. M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256(1–4), 50–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.008>
- Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2014). Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 30–40. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12186>
- Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., MacKey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., & Rawls, J. F. (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host and Microbe*, 12(3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>
- Serra, D., Almeida, L. M., & Dinis, T. C. P. (2018). Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis. *Trends in Food Science and Technology*, 78(February), 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.007>
- Sherrard, L. J., Graham, K. A., McGrath, S. J., McIlreavey, L., Hatch, J., Muhlebach, M. S., Wolfgang, M. C., Gilpin, D. F., Elborn, J. S., Schneiders, T., & Tunney, M. M. (2013). Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), 2369–2374. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt191>
- Shivaji, S., Jayasudha, R., Chakravarthy, S. K., SaiAbhilash, C. R., Sai Prashanthi, G., Sharma, S., Garg, P., & Murthy, S. I. (2021). Alterations in the conjunctival surface bacterial microbiome in bacterial keratitis patients. In *Experimental Eye Research* (Vol.

- 203). <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108418>
- Small, C. M., Currey, M., Beck, E. A., Bassham, S., & Cresko, W. A. (2019). Highly Reproducible 16S Sequencing Facilitates Measurement of Host Genetic Influences on the Stickleback Gut Microbiome. *MSystems*, 4(4), 1–20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00331-19>
- Smith, C. C. R., Snowberg, L. K., Gregory Caporaso, J., Knight, R., & Bolnick, D. I. (2015). Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *ISME Journal*, 9(11), 2515–2526. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.64>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). Reports 1000. *The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis*, 341(August), 569–574.
- Smriga, S., Sandin, S. A., & Azam, F. (2010). Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1), 31–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00879.x>
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K. F., & Gram, L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, 182(1–2), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00250-1)
- Star, B., Haverkamp, T. H. A., Jentoft, S., & Jakobsen, K. S. (2013). Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-248>
- Steinberg, C. E. W. (2018). Aquatic animal nutrition: A mechanistic perspective from individuals to generations. In *Aquatic Animal Nutrition: A Mechanistic Perspective from Individuals to Generations*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91767-2>
- Stephens, W. Z., Burns, A. R., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K., & Bohannan, B. J. M. (2016). The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME Journal*, 10(3), 644–654. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.140>
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R., Kilham, S. S., & Russell, J. A. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21(13), 3363–3378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Song, K., & Li, J. S. (2012). Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 281–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00894.x>
- Sundh, H., & Sundell, K. S. (2015). Mucosal Health in Aquaculture Environmental impacts on fish mucosa. In *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2/00007-8>
- Surono, I. S., Widiyanti, D., Kusumo, P. D., & Venema, K. (2021). Gut microbiota profile of Indonesian stunted children and children with normal nutritional status. *PLoS ONE*, 16(1 January), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245399>
- Swaim, L. E., Connolly, L. E., Volkman, H. E., Humbert, O., Born, D. E., & Ramakrishnan, L.

- (2006). *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infection and Immunity*, 74(11), 6108–6117. <https://doi.org/10.1128/IAI.00887-06>
- Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Andoh, A., & Sugimoto, M. (2016). Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, 93(1), 59–65. <https://doi.org/10.1159/000441768>
- Talamantes, M., Schneeberg, S. R., Pinto, A., & Perron, G. G. (2021). Passive exposure to cannabidiol oil does not cause microbiome dysbiosis in larval zebrafish. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100045. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100045>
- Tang, Y., Sun, F., Li, X., Zhou, Y., Yin, S., & Zhou, X. (2011). Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of escherichia coli lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*, 37(12), 1653–1658. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.015>
- Taras, D., Simmering, R., Collins, M. D., Lawson, P. A., & Blaut, M. (2015). *Reclassification of Eubacterium formicigenerans Holdeman and Moore 1974 as Dorea formicigenerans gen. nov., comb. nov., and description of Dorea longicatena sp. nov., isolated from human faeces. 2002*, 423–428.
- Teixeira, C. G., Fusieger, A., Milião, G. L., Martins, E., Drider, D., Nero, L. A., & de Carvalho, A. F. (2021). Weissella: An Emerging Bacterium with Promising Health Benefits. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(4), 915–925. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09751-1>
- Tsuchiya, C., Sakata, T., & Sugita, H. (2008). Novel ecological niche of Cetobacterium somerae, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1), 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *Journal of Physiology*, 587(17), 4153–4158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H., & Francino, M. P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biology and Evolution*, 2(1), 53–66. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp057>
- Van Hul, M., Le Roy, T., Prifti, E., Dao, M. C., Paquot, A., Zucker, J. D., Delzenne, N. M., Muccioli, G., Clément, K., & Cani, P. D. (2020). From correlation to causality: the case of Subdoligranulum. *Gut Microbes*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1849998>
- van Kessel, M. A. H. J., Dutilh, B. E., Neveling, K., Kwint, M. P., Veltman, J. A., Flik, G., Jetten, M. S. M., Klaren, P. H. M., & Op den Camp, H. J. M. (2011). Pyrosequencing of 16s rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (Cyprinus carpio L.). *AMB Express*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>
- Wei, Q., Li, Z., Gu, Z., Liu, X., Krutmann, J., Wang, J., & Xia, J. (2022). Shotgun metagenomic sequencing reveals skin microbial variability from different facial sites. *Frontiers in Microbiology*, 13(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933189>

- Wilhelmus, K. R., Robinson, N. M., & Jones, D. B. (1979). Bacterionema matruchotii ocular infections. *American Journal of Ophthalmology*, 87(2), 143–147. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(79\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0002-9394(79)90132-6)
- Wilson, B., Danilowicz, B. S., & Meijer, W. G. (2008). The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microbial Ecology*, 55(3), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9288-0>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, Wu, R., D, G., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., ... Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with. *Science*, 334(6052), 105–109.
- Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y., & Wang, G. (2010). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1–4), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.025>
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., & Yi, M. (2018). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 76, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>
- Xu, M., Li, F., Zhang, X., Chen, B., Geng, Y., Ouyang, P., Chen, D., Li, L., & Huang, X. (2024). Microbiome analysis reveals the intestinal microbiota characteristics and potential impact of *Procambarus clarkii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12914-5>
- Yang, S., Xu, W., Tan, C., Li, M., Li, D., Zhang, C., Feng, L., Chen, Q., Jiang, J., Li, Y., Du, Z., Luo, W., Li, C., Gong, Q., Huang, X., Du, X., Du, J., Liu, G., & Wu, J. (2022). Heat Stress Weakens the Skin Barrier Function in Sturgeon by Decreasing Mucus Secretion and Disrupting the Mucosal Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 13(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.860079>
- Yang, Y., Zhu, Y., Liu, H., Wei, J., Yu, H., & Dong, B. (2022). Cultivation of gut microorganisms of the marine ascidian *Halocynthia roretzi* reveals their potential roles in the environmental adaptation of their host. *Marine Life Science and Technology*, 4(2), 201–207. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00131-4>
- Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., & Liu, W. T. (2014). Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME Journal*, 8(3), 541–551. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.181>
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najjar FZ, Roe BA, Elshahed MS. Comparação de estimativas de riqueza de espécies obtidas usando fragmentos quase completos e fragmentos simulados gerados por pirosequenciamento em levantamentos ambientais baseados no gene 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(16):5227-5236. DOI:10.1128/AEM.00592-09.
- Yuan, Z., Wang, J., Che, R., God'spower, B. O., Zhou, Y., Dong, C., Li, L., Chen, M., Eliphaz, N., Liu, X., & Li, Y. (2021). Relationship between L-lactate dehydrogenase and multidrug resistance in *Staphylococcus xylosus*. *Archives of Microbiology*, 204(1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02625-8>
- Yúfera, M., Conceição, L. E. C., Battaglione, S., Fushimi, H., & Kotani, T. (2011). Early Development and Metabolism. In *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species*. <https://doi.org/10.1002/9781444392210.ch5>

- Zhang, L., Lee, H., Grimm, M. C., Riordan, S. M., Day, A. S., & Lemberg, D. A. (2014). *Campylobacter concisus* and inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(5), 1259–1267. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1259>
- Zhang, L., Wang, Y., Wei, L., Wang, Y., Shen, X., & Li, S. (2013). *Taibaiella smilacinae* gen. nov., sp. nov., an endophytic member of the family Chitinophagaceae isolated from the stem of *Smilacina japonica*, and emended description of *Flaviumibacter petaseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART10), 3769–3776. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.051607-0>
- Zhang, X., Zhao, Y., Xu, J., Xue, Z., Zhang, M., Pang, X., Zhang, X., & Zhao, L. (2015). Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Scientific Reports*, 5(September), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14405>
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall, London.
- Zhou, Y., Luo, Y., Wang, X., Luan, F., Peng, Y., Li, Y., Ma, X., Jia, X., Li, N., Man, M., Wei, J., Ji, Y., Zhang, Q., Wang, C., Mu, W., Wang, J., Wang, C., Zhao, M., & Yu, K. (2023). Early gut microbiological changes and metabolomic changes in patients with sepsis: a preliminary study. *International Microbiology*, 26(4), 1131–1142. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00363-z>
- Zhou, Z. (2003). [On the evolution of feathers]. *Science Journal Kagaku*, 73(13), 665–668.
- Zhou, Z., Shi, P., He, S., Liu, Y., Huang, G., Yao, B., & Ringø, E. (2009). Identification of adherent microbiota in the stomach and intestine of emperor red snapper (*Lutjanus sebae* Cuvier) using 16S rDNA-DGGE: Short communication. *Aquaculture Research*, 40(10), 1213–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02209.x>