



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Tamiris Henrique Ferreira

Microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* distribuído ao longo do alto Rio Uruguai.

Florianópolis

2022

Tamiris Henrique Ferreira

Microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* distribuído ao longo do alto Rio Uruguai

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: José Luiz Pedreira Mouriño.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Tamiris Henrique

Microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* distribuído
ao longo do alto Rio Uruguai / Tamiris Henrique Ferreira
; orientador, José Luiz Pedreira Mouriño, 2022.

84 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Limnoperna fortunei*. 3. microbiota
digestiva. 4. SAR. 5. core microbiota. I. Mouriño, José
Luiz Pedreira . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.
Título.

Tamiris Henrique Ferreira

Microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* distribuído ao longo do alto Rio Uruguai

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof^a. Cristhiane Guertler, Dr^a.
Instituto Federal Catarinense - IFC

Dr^a. Marcela Maia Yamashita
Help Fish

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. José Luiz Pedreira Mouriño Dr.
Orientador

Florianópolis, 2022.

Dedico

Aos meus pais M^a Eglair e Wesley, minhas irmãs Thalita e Thaís e meu fiel companheiro de quatro patas, Toquinho. Sem todo incentivo, carinho e ensinamentos nada seria possível e certamente são de grande importância nas minhas realizações.

Ofereço a todos que enfrentaram a pandemia e as vítimas da COVID 19 (*in memoriam*).

“São chegados os tempos em que os ensinamentos do Cristo hão de receber o seu complemento; em que o véu lançado intencionalmente sobre algumas partes desse ensino tem de ser levantado; em que a Ciência, deixando de ser exclusivamente materialista, tem de levar em conta o elemento espiritual; em que a Religião, deixando de ignorar as leis orgânicas e imutáveis da matéria, essas duas forças — Ciência e Religião — apoiando-se uma na outra, marcharão combinadas e se prestarão mútuo concurso. Então, não mais desmentida pela Ciência, a Religião adquirirá inabalável poder, porque estará de acordo com a razão e já não se lhe poderá opor a irresistível lógica dos fatos.

A Ciência e a Religião não puderam entender-se até hoje porque cada uma, encarando as coisas do seu ponto de vista exclusivo, repeliam-se mutuamente. Era preciso alguma coisa para preencher o vazio que as separava, um traço de união que as aproximasse. Esse traço de união está no conhecimento das leis que regem o mundo espiritual e suas relações com o mundo corpóreo, leis tão imutáveis quanto as que regem o movimento dos astros e a existência dos seres. Uma vez constatadas pela experiência essas relações, fez-se uma nova luz: a fé dirigiu-se à razão, a razão nada encontrou de ilógico na fé, e o materialismo foi vencido.”

(Allan Kardec)

“Celui qui déplace une montagne commence par déplacer de petites pierres.”

Confucius

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Cogito, ergo sum

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais M^a Eglair e Wesley, e às minhas irmãs Thalita e Thaís que sempre estiveram ao meu lado nos piores e melhores momentos, os anos se passaram como um piscar de olhos, devo toda minha força e resiliência a vocês.

Ao meu cachorrinho, Toquinho, pela companhia e amor incondicional. Nos momentos de ansiedade fostes fundamental para que eu voltasse para meu eu em essência e me fez praticar da forma mais bela a paciência. Se por um minuto você pudesse falar, certamente seria um “amo-te”.

Ao Dr. José Luiz Pedreira Mouriño pela orientação e confiança em mim depositada durante os quatro anos de doutorado e na realização deste trabalho. Sou muito grata pelo aprendizado, pela experiência, pela convivência que tivemos e principalmente pela paciência.

Ao eterno mestre Dr. Pedro Carlos Cunha Martins, pelo incentivo ao crescimento profissional e por sempre acreditar e me fazer ver que eu sou capaz afinal, no meio acadêmico, tudo tem um “pelinho de sapo”.

Aos queridos integrantes do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS): Lúvia, Bruno Pierri, Paula, Domickson, Lucas, Gracienhe, Maria Clara, Matheus Berlofa, Manoela, Thalita Gogola, Hugo, Thaís Lisboa e Zezinho por se disponibilizarem sempre que necessário.

À toda equipe do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), em especial a: Janaina, Renata, Pedrão, Jurandir, Sunshine, Josiane, Prof. Alex, Samara, por toda paciência para transmitir informações fundamentais para desenvolvimento deste.

Aos queridos servidores do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAq): Juliano, Marília, Sarita, Silvia e Simone por serem tão prestativos nos momentos em que precisei.

Ao técnico Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Jacó Mattos, pela expertise impecável e dedicação para auxiliar no desenvolvimento das análises de extração de DNA no auge da pandemia.

Aos amigos Lucas Cardoso e Vitor de Almeida Pontinha (*in memoriam*) minha eterna gratidão, o mérito dos resultados deste são, sem dúvidas, consequência de toda paciência e dedicação de vocês, creio que sem todo esse apoio nada teria se concretizado. Pessoas que, além de toda parceria, me fizeram acreditar que a empatia ainda existe e que a capacidade de exercê-la vem sempre a companhia de seres humanos maravilhosos. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de trabalhar e conviver com vocês, estes me fizeram crescer intelectualmente e espiritualmente.

À família Laffitte Fernandes (segunda família) por todo carinho e incentivo nos momentos difíceis.

À família Locks Ferreira por gentilmente me acolher durante toda essa jornada em Florianópolis.

À família nordestina que surgiu em Florianópolis: Hortência, Renata, Gicella e Paula tenho vocês no coração. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, pelas brigas, pelas gargalhadas e principalmente pela amizade e compreensão. Selvaaaaa !!!!

Às eternas amigas Emanuely, Érica, Nathalia e Viviane Medeiro, por toda paciência e por sempre se mostrarem presente nos momentos que eu mais precisei. Mesmo longe

fizeram questão de mostrar que a amizade é verdadeira e que eu tenho um espacinho reservado no coração de cada uma.

Ao amigo Marcelo Pretani que esteve ao meu lado na reta final da elaboração desta tese, proporcionando-me momentos valiosos de descontração, onde conversávamos sobre os mais diversos assuntos. Talvez não existam palavras suficiente que me permitam agradecer justamente e de forma merecida toda a parceria. Com seu auxílio consegui ultrapassar dificuldades surgidas e me superar ainda mais. Gratidão!

Aos professores da Pós-Graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos e aprendizado.

Ao Carlito Klunk, pelo auxílio e compreensão e muita paciência nas questões administrativas.

À Engie Brasil Energia, Itá Energética, Energética Barra Grande, Campos Novos Energia, Foz do Chapecó Energia, financiadores desta pesquisa desenvolvida no âmbito do Programa de P&D regulado pela ANEEL (PD-00403-0043/2017).

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela Bolsa de Doutorado.

A Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar o acesso a pesquisa, ensino e extensão de excelência.

A todos aqueles que não foram citados, mas ajudaram de alguma forma, meu muito obrigada!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi identificar a microbiota digestiva do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) para detectar a presença de microrganismos oriundos de efluentes e possivelmente nocivos à saúde humana e a de peixes, identificar a microbiota digestiva deste invasor e caracterizar a sua estrutura em diferentes estações do ano. As amostragens de *L. fortunei* foram coletadas em cinco reservatórios de usinas hidrelétricas (UHE), localizadas na região do alto rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil. Em cada um dos reservatórios foram amostrados três pontos, para cada ponto 15 mexilhões foram submetidos a biometria e armazenados em caixas térmicas refrigerada (4,0 °C). Posteriormente, cada mexilhão foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada do divertículo digestivo e de porções do intestino, identificado e armazenado individualmente em microtubos livres de RNase e DNase e preservados a -20 °C. Após a extração DNA das bactérias presentes no material coleado, as amostras foram submetidas ao Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR) e análises de metagenômica. As análises do SAR revelaram que o *L. fortunei* presente nos reservatórios de UHE do alto Rio Uruguai possuem uma microbiota que se diferencia entre os pontos coletados, com variações de composição do trato digestivo. Os Filos dominantes foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria, independentemente da estação do ano, tendo sido identificadas 142 *Operational Taxonomy Units* (OTUs) compartilhadas entre as amostras do inverno e verão que não sofreram influência do período coletado, e que indicaram a formação de uma *core microbiota*.

Palavras-chaves: Aquicultura, *Limnoperna fortunei*, microbiota digestiva, SAR, *core microbiota*.

ABSTRACT

The objective of the present study was to identify the digestive microbiota of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) to evaluate the presence of microorganisms from effluents and that are possibly harmful to human and fish health; to identify the digestive microbiota of this invasive microorganism and to characterize its structure in different seasons of the year. The samples of *L. fortunei* were collected in five reservoirs of hydroelectric plants (UHE), located in the region of the upper Uruguay River, Santa Catarina, Brazil. In each of the reservoirs, three points were sampled, for each point 15 mussels were submitted to biometrics and stored in refrigerated thermal boxes (4.0 °C). Subsequently, each mussel was aseptically opened with the aid of a sterilized scalpel to remove the digestive diverticulum and portions of the intestine, identified and stored individually in RNase and DNase-free microtubes and preserved at -20 °C. After DNA extraction from the bacteria present in the collected material, the samples were submitted to High Throughput Sequencing and metagenomic analysis. The SAR analyzes revealed that the *L. fortunei* present in the reservoirs of the UHE of the upper Rio Uruguai have a microbiota that differs between the collected points, with variations in the composition of the digestive tract. Furthermore, the dominant phyla were Proteobacteria, Bacteroidetes and Cyanobacteria, regardless of the season. In addition to the identification of 142 Operational Taxonomy Units (OTUs) shared between winter and summer samples that were not influenced by the period collected indicated the formation of a microbiota core.

Keywords: Aquaculture, *Limnoperna fortunei*, digestive microbiota, SAR, core microbiota

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica *UniFrac* Ponderada, indicando a ordenação das comunidades microbianas presentes no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). 34
- Figura 2** - *Operational Taxonomic Units*, em nível de espécie, singulares e compartilhadas, da microbiota bacteriana presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). Cada elipse representa um conjunto de comunidades microbianas. A intersecção de duas ou mais elipses mostra o número de OTUs compartilhadas entre conjuntos. Os números fora da área de intersecção correspondem às OTUs que foram encontradas exclusivamente em mexilhões de um determinado reservatório. 35
- Figura 3** - Microbiota bacteriana (abundância relativa de OTU), em nível de Filo, presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). 36
- Figura 4** - Localização das barragens, pontos de coleta e gráficos de abundância relativa da composição taxonômica, por Filo, da microbiota bacteriana presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). **Erro! Indicador não definido.**37
- Figura 5** - Microbiota bacteriana (abundância relativa de OTU), em nível de gênero, presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). 38

Figura 6 - Mapa de calor, para o nível de gênero, da microbiota digestiva presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). Eixo x: identificação dos pontos de coleta das amostras; Eixo y: proporções de OTUs).....39

ARTIGO 2

Figura 1 - Localização das barragens e pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai.....61

Figura 2 - Curvas de rarefação para as bibliotecas 16S rRNA bacterianas. Curvas do índice Chao1 onde: A) Curvas que indicam riqueza de espécies no inverno. B) Curvas que indicam riqueza de espécies no verão.....65

Figura 3 - Abundância relativa da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Filo66

Figura 4 - Abundância relativa da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Gênero. A) Gêneros dominantes em amostras do inverno. B) Gêneros dominantes em amostras do verão.....67

Figura 5 - Diagrama de *Venn* indicando OTUs (*Operational Taxonomic Units*) singulares e compartilhadas, em nível de espécie, da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Cada elipse representa um conjunto. A intersecção das duas elipses denota o número de OTUs compartilhadas entre conjuntos. Números fora da área de intersecção correspondem ao número de OTUs exclusivos de determinado conjunto.....68

Figura 6 - A composição taxonômica bacteriana nas amostras digestivas do mexilhão-dourado demonstrada como abundância relativa. A) Amostras demonstradas a nível de espécie no período do inverno. B) Amostras demonstradas a nível de espécie no período do verão. O gráfico *Krona* foi gerado através do *Excel template*. As porcentagens de leituras atribuídas são apresentadas com os táxons.....69

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** - Comprimento dos mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) e temperatura (°C), pH e concentração de oxigênio dissolvido (mg l-1), amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).....31
- Tabela 2** - *Operational Taxonomy Units* (OTU), Chao1, *Shannon*, *Inverse Simpson* e *Good's Coverage* estimadas nas amostras dos tratos digestivos de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).....33

ARTIGO 2:

- Tabela 1** - Resumo da análise dos dados obtidos a partir do sequenciamento de alto rendimento (SAR) em amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai.....64
- Tabela 2** - Parâmetros de qualidade de água, temperatura (°C), pH e concentração de oxigênio dissolvido (mg L-1), amostrados nos diferentes pontos de coleta do alto Rio Uruguai.....64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1	HISTÓRICO DA BIOINVASÃO AQUÁTICA NO BRASIL.....	15
1.2	PROBLEMÁTICA DOS BIOINVASORES	16
1.3	BIOINVASÃO DO <i>Limnoperna fortunei</i>	18
1.4	IMPACTOS OCASIONADO PELO <i>Limnoperna fortunei</i>	19
1.5	MÉTODOS DE CONTROLE.....	21
1.6	PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE COMERCIAL.....	22
1.6.1	Interesse ambiental	22
1.6.2	Biorremediação	23
1.6.3	Probióticos	24
1.7	MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTURA: Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR).....	25
1.8	OBJETIVOS	26
1.8.1	Objetivo Geral	26
1.8.2	Objetivos Específicos	26
1.9	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	27
2	ARTIGOS	28
2.1	ARTIGO 1	28
2.1.1	Introdução	29
2.1.2	Material e Métodos	30
2.1.2.1	<i>Local de coleta</i>	30
2.1.2.2	<i>Armazenamento e Preparo das Amostras</i>	30
2.1.2.3	<i>Extração de DNA</i>	31
2.1.2.4	<i>Amplificação da PCR.....</i>	31
2.1.2.5	<i>Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)</i>	32
2.1.2.6	<i>Análises estatísticas</i>	32
2.1.3	Resultados	32
2.1.3.1	<i>Similaridade das comunidades bacterianas</i>	33
2.1.3.2	<i>Microbiota bacteriana do trato digestivo de <i>Limnoperna fortunei</i></i>	35
2.1.4	Discussão	40
2.1.5	Conclusões	44
2.1.6	Agradecimentos	44

	REFERÊNCIAS	45
	DADOS SUPLEMENTARES	51
2.2	ARTIGO 2	59
2.2.1	Introdução	60
2.2.2	Material e métodos	61
2.2.2.1	<i>Local de coleta</i>	61
2.2.2.2	<i>Armazenamento e preparo das amostras</i>	62
2.2.2.3	<i>Extração de DNA</i>	62
2.2.2.4	<i>Amplificação da PCR</i>	62
2.2.2.5	<i>Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)</i>	62
2.2.2.6	<i>Análises estatísticas</i>	63
2.2.3	Resultados	63
2.2.4	Discussão	70
2.2.5	Conclusões	72
2.2.6	Agradecimentos	72
	REFERÊNCIAS	73
	DADOS SUPLEMENTARES	76
3	CONCLUSÃO GERAL	77
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 HISTÓRICO DA BIOINVASÃO AQUÁTICA NO BRASIL

A introdução de espécies exóticas em diversos ecossistemas, principalmente os aquáticos, é considerada como uma das maiores causas da perda de biodiversidade global (USC, 2017; STACHOWICZ; WHITLATCH; OSMAN, 1999). Este fenômeno, conhecido como invasão biológica ou bioinvasão (NISC, 2017), é cientificamente reconhecido há muito tempo (ELTON, 1958) e tem demonstrado uma real preocupação da comunidade científica brasileira, pois espécies exóticas introduzidas em ecossistemas naturais aos quais não pertenciam é, geralmente, mediada pela ação antrópica e pode afetar tanto a biodiversidade como atividades econômicas (CARLTON, 1992; TEIXEIRA et al., 2010). Embora haja uma tendência de acréscimo das ocorrências de bioinvasão em ambientes aquáticos, não é possível afirmar se este acontecimento se deve ao agravamento do problema ou se apenas reflete resultados obtidos através de trabalhos científicos e conscientização (SOUZA et al, 2009).

Apesar da diligência existente para gerar informações sobre a problemática das bioinvasões nas águas brasileiras, os dados publicados pertencem em sua maioria as invasões de organismos aquáticos na América do Norte e Europa, no entanto, países pertencentes a África, o Oceano Índico, o sudoeste do Oceano Pacífico e a América Latina ainda possuem relatos escassos (PYŠEK et al., 2008). No Brasil, historicamente, a introdução de organismos invasores é comum e está fortemente associada aos avanços tecnológicos, sendo dividido em três fases: do Descobrimento até o final do século XIX; o século XX; e a partir do século XXI (SOUZA et al, 2009).

A primeira fase corresponde à época da escravidão onde os navios que transportavam os negros trazidos da África apresentavam incrustações em seus cascos, sendo responsável pela introdução de espécies marinhas no litoral brasileiro (SOUZA et al, 2009). Três espécies foram consideradas introduzidas nesse período: o mexilhão *Perna perna* (SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2005), o vibrião da cólera *Vibrio cholerae* e a ascídia *Styela plicata* (RIVERA et al., 2003; SOUZA et al., 2009). A segunda fase é marcada pelos avanços tecnológicos e econômicos em todo mundo, havendo uma intensificação do comércio marítimo agravando o transporte de espécies exóticas através das águas de lastros dos navios (SOUZA et al, 2009). Após esta fase, as invasões biológicas passaram a ser vista de uma forma mais ampla, abrangendo conhecimentos relacionados a biologia e biogeografia das espécies, bem como as relações inter e intraespecíficas e o monitoramento do ambiente marinho tornando-se fundamentais para o gerenciamento do problema da bioinvasão, havendo necessidade de

investir nos procedimentos de prevenção e controle (SOUZA et al, 2009).

1.2 PROBLEMÁTICA DOS BIOINVASORES

Mesmo antes das grandes navegações, as espécies de plantas e animais já estavam naturalmente se expandindo e/ou regredindo sua distribuição. O processo de expansão da distribuição é, de fato, um processo natural que ainda hoje acontece quando barreiras biogeográficas são transpassadas. Tal processo pode acontecer desde em escalas geológicas, incluindo milhares de anos (ex. glaciações e deglaciações), até períodos curtos de poucos anos, dependendo dos eventos em questão (ex. El Niño). Nos dias de hoje o grande avanço tecnológico alcançado pela civilização proporciona uma aceleração em tal processo. Esse "auxílio" no aumento do transporte de espécies e consequente aumento da distribuição das mesmas no planeta acontecem de tal forma que centenas de espécies se tornaram reconhecidamente cosmopolitas, colocando o processo de bioinvasão dentre os mais importantes impactos na perda de biodiversidade do planeta (MCKINNEY & LOCKWOOD, 2005).

Com respeito a bioinvasões no ambiente aquático, a pesca recreativa, aquicultura e aquariofilia são, atualmente, as atividades que mais causam introduções em águas continentais. Introduções de espécies oriundas de outras regiões resultam em grandes impactos sobre a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos continentais. No caso da fauna e flora de água doce, a transposição de espécies de uma bacia hidrográfica para outra pode representar uma grande ameaça, ainda que no mesmo continente. Introduções de organismos, principalmente peixes, tanto de espécies nativas como exóticas, são comuns no Brasil e resultam da falta de informação sobre os problemas que a bioinvasão pode causar. Os peixes amazônicos, por exemplo, estão entre as espécies mais introduzidas em outras bacias hidrográficas no Brasil, sendo o tucunaré (*Cichla* sp.) um dos mais comuns em introduções (NASCIMENTO et al., 2001). Agostinho et al., (2005) relatam que na bacia do rio Paraná os piscívoros da Amazônia são os que alcançam maior sucesso. Gomes et al. 2007, em estudos no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), descreve uma redução da biodiversidade resultante do aumento de biomassa de peixes introduzidos na Lagoa da Carioca. Do mesmo modo, Godinho et al. 1993, em estudo mais geral do problema da bioinvasão no PERD nos últimos 50 anos, demonstra que a riqueza de espécies de peixes vem declinando em todos os lagos do parque em que houve introdução de espécies. De maneira semelhante, no ambiente marinho, nota-se que, embora tenha havido um aumento na diversidade estrutural e funcional causado pelas espécies não-nativas e mediado pela intervenção humana (fato que vem sendo tratado na literatura como xenodiversidade, xenos gr.

alienígena, estrangeiro), é possível observar, também, que a composição da biota de todo o mundo tem ficado mais similar, ou seja, a disseminação de espécies promove o fenômeno chamado de "homogeneização antropogênica".

O estudo da biogeografia, por outro lado, tem sido importante no entendimento de como uma espécie exótica é detectada ou se estabelece num novo ambiente, incluindo quais os fatores que possibilitam sua expansão, além de quais fatores podem levar as mesmas a uma possível extinção (BRIGGS, 2007). Portanto, baseado nos padrões de distribuição geográfica é possível definir que espécies seriam, à primeira vista, exóticas. De fato, estudos recentes demonstram que a distribuição atual de várias espécies nativas é nada mais que o produto de vários eventos passados de invasão (SOUZA et al, 2009). As barreiras ecológicas ou físicas se modificam de acordo com as configurações dos oceanos e continentes através de barreiras ocasionadas pelo tempo geológico, limitando, assim, a distribuição das espécies e permitindo as diferentes formas de dispersão simultaneamente (SOUZA et al, 2009).

A dispersão de espécies invasoras está ameaça à biodiversidade, criando desafios extensos ao bem-estar das populações humanas. Embora a problemática seja de caráter mundial, a natureza e a severidade dos impactos sobre a sociedade, a economia e a saúde variam entre diferentes países e regiões. Podemos citar a diminuição de produção de espécies de cultivo, aumento, aumentam os custos referente a ao manejo e reduzem o suprimento de água degradando ecossistemas e ambientes de água potável (SOUZA et al, 2009). O descarte de águas de lastro de navio que introduz diversos tipos de organismo, como vírus e bactérias, que causam ampla degradação tanto de sistemas dulcícolas como marítimos, a introdução de organismos que ocasionam enfermidades, levando a morte ou incapacitam milhões de pessoas a cada ano, com profundas implicações sociais e econômicas. A interação entre patógeno, homem e a economia é complexo e depende da influência e intensidade da doença, as populações afetadas e as suscetíveis, o padrão de instalações do homem e o seu nível de escolaridade (SOUZA et al, 2009).

Além dos custos diretos que estão associados ao manejo de invasoras, os custos econômicos também incluem as consequências ambientais indiretas das invasões e outros valores que não integram o mercado. Por exemplo, espécies invasoras podem provocar distúrbios no ciclo hidrológico, determinando a necessidade de serviços que incluem o controle de cheias e suprimento de água, a assimilação de dejetos, a ciclagem de nutrientes, a conservação e regeneração de ambientes etc. Tais serviços têm tanto valor atual quanto valor potencial no futuro (GISP, 2005).

1.3 BIOINVASÃO DO *Limnoperna fortunei*

As constantes alterações ambientais (deliberadas ou acidentais) provocadas pela dispersão humana acarretam uma série de modificações na composição das populações originais. Espécies vegetais, animais e de outros grupos têm sido, cada vez mais, introduzidas e disseminadas pelo homem. Muitas destas espécies se tornam invasoras, multiplicando-se a tal ponto de causarem grandes transtornos ambientais, econômicos ou mesmo sociais (GOLLASCH, 2002).

Limnoperna fortunei (Dunker 1857), vulgarmente conhecido como mexilhão-dourado, é um molusco bivalve Mytilidae, da mesma família dos mexilhões marinhos. A espécie é nativa de rios e arroios chineses e do sudeste asiático e, apenas recentemente, através da água de lastro de navios aportou na América do Sul, onde chegou em 1991 (DARRIGRAN & ESCURRA DE DRAGO, 2000).

Desde então, a espécie expandiu sua distribuição rapidamente para as porções superiores da Bacia do rio Paraná, invadindo principalmente os grandes rios, numa velocidade de cerca de 240 km/ano (DARRIGRAN, 2002). *L. fortunei* atingiu o rio Paraguai em 1997/98, alcançando a região de Corumbá em 2000. Neste mesmo ano, sua presença foi reportada na Usina de Itaipu (ZANELLA & MARENDA, 2002) e em 2002, em usinas hidrelétricas a jusante do Rio Paraná, em São Paulo (OLIVEIRA et al., 2004).

A dispersão de uma espécie invasora como o mexilhão-dourado *L. fortunei* é bastante facilitada pelas suas características biológicas, principalmente a existência de uma fase larval planctônica e da capacidade de incrustação dos indivíduos jovens e adultos. Assim, a dispersão ocorre através da movimentação da água e é facilitada pela integração entre corpos hídricos de diferentes sistemas (LODGE et al. 1998).

A invasão e colonização de vários ambientes por *L. fortunei* já é um fato consumado nos estados que fazem limite com as bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. No estado de São Paulo, sua presença foi reportada em muitas hidrelétricas que utilizam água do rio Paraná nas UHE Ilha Solteira, Porto Primavera e Jupia (Oliveira et al., 2004) e do Paranapanema, na UHE Rosana (AVELAR et al. 2004). Entretanto, no estado do Paraná o levantamento de informações sobre a presença da espécie quase não existe, limitando-se a raros registros (ZANELLA & MARENDA, 2002; TAKEDA et al. 2003a). Belz et al. (2005) realizaram a prospecção em diversos reservatórios do estado e a presença do mexilhão não foi detectada em nenhum deles. O mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* é uma espécie invasora de rios e estuários chineses. Em 1965, foi introduzido em Hong Kong, e por volta de 1990 em Taiwan, Japão e Argentina, neste último caso muito provavelmente através do estuário do Rio da Prata

via água de lastro de navios (PASTORINO et al., 1993; RICCIARDI, 1998; ITO, 2015). Este mexilhão se espalhou por cinco países da América do Sul (Argentina, Uruguai, Brasil, Paraguai e Bolívia) atingindo densidades de cerca de 200.000 indivíduos m² (BOLTOVSKOY et al., 2006). Vários relatórios sugeriram que *L. fortunei* pode se espalhar para a Europa e América do Norte em um futuro próximo (RICCIARDI, 1998; BOLTOVSKOY et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010, 2015).

1.4 IMPACTOS OCASIONADO PELO *Limnoperna fortunei*

Os Impactos ambientais ocasionados pela invasão do mexilhão-dourado foram relatadas na literatura sobre diferentes componentes que integram o ecossistema de água doce relacionados a fatores bióticos e abiótico. Dentre esses fatores, pode-se destacar os habitats aquáticos que, quando apresenta grandes quantidades de larvas, sofrem alteração na transparência da coluna da água devido a acentuada capacidade de filtração dos organismos adultos, além da sua aglomeração em substratos duros contribuindo para modificação das estruturas, bem como a qualidade do ambiente devido a liberação excessiva de pseudofezes (UHDE et al., 2012, BOLTOVSKOY et al., 2015b; KARATAYEV et al., 2015).

O acúmulo de nutrientes ocasionados pelas pseudofezes do *L. fortunei* afeta, mesmo que indiretamente, a comunidade de macrófitas aquáticas e Perifiton, devido as alterações ocasionadas na qualidade da água (KARATAYEV et al., 2015). Conforme relatado por Mansur et al., 2003, os rizomas do junco (*Scirpus californicus*) presente no Lago Guaíba, município de porto Alegre (RS), foram afetados pelo acúmulo de mexilhão-dourado fixados na base das plantas, bem como pelas pseudofezes, que culminaram no apodrecimento dos rizomas por falta de oxigenação.

Outra comunidade afetada diretamente pelas altas densidades do mexilhão-dourado são os organismos planctônicos (fitoplâncton e zooplâncton) dispersos no ambiente aquático, que sofrem decréscimo, modificando a composição e produtividade do ambiente (KARATAYEV et al., 2015). Frau et al. (2016) relatam que o fato de o mexilhão-dourado se alimentar tanto do zooplâncton quanto do fitoplâncton, simultaneamente, não diminui o impacto na estrutura da comunidade de fitoplâncton, considerando que a presença de zooplâncton não tem efeito sobre a escolha da maioria dos grupos de fitoplâncton.

A fauna bentônica também é afetada pela presença do *L. fortunei*, devido ao aumento da densidade e diversidade de organismo presente na comunidade bentônica marginal (KARATAYEV et al., 2015). Diversos registros literários reunidos por Sylvester e Sardina (2015) demonstraram os efeitos do mexilhão-dourado sobre a biomassa, abundância e riqueza

de organismos zoobentônicos, com: aumento da abundância de anelídeos e de larvas de insetos; aumento da abundância e biomassa de Hydrozoa, Turbellaria, Tardigrada, de moluscos Gastropoda, microcrustáceos e ácaros aquáticos e o aumento da abundância, biomassa e riqueza de anelídeos e microcrustáceos. Os efeitos sobre a redução de abundância e biomassa de moluscos Gastropoda e quanto à abundância e riqueza de moluscos bivalves nativos de água doce (*Anodontites*, *Diplodon* e *Corbicula*), também foram relatos pelos mesmos autores.

As incrustações ocasionadas pelo mexilhão-dourado sobre conchas da comunidade local afetam a estrutura e a composição de organismos, sendo uma das ameaças à conservação de algumas espécies, como bivalves (*Leila blainvilliana*, *Diplodon deceptus*, *Diplodon hildae* e *Diplodon koseritzi*) e o gastrópode (*Pomacea canaliculata*) (MANSUR et al., 1999, 2003; SANTOS et al., 2012a).

Estudos realizados através de experimentos laboratoriais e dados coletados a nível de campo, revelaram que fatores abióticos, como a qualidade da água, são afetadas pela população do mexilhão-dourado, que através da filtração diminuindo as concentrações de matéria orgânica particulada na coluna d'água, aumento da transparência da água, diminuição do séston, do fitoplâncton e da produtividade primária e aumenta as concentrações de amônia, nitrato e fosfato, ocasionando aumento da relação fósforo/nitrogênio, (BOLTOVSKOY et al., 2015b; KARATAYEV et al., 2015)

Os impactos de ordem econômica afetam, sobretudo o setor elétrico, por meio da danificação de equipamentos e redução de eficiência da geração de energia (IBAMA, 2017). Os danos estruturais aos equipamentos de resfriamento, grades, filtros, bombas, tubulações, bastidores, grelhas, telas, tanques de armazenamento, poços de bomba, túneis de entrada de água, instrumentação de monitoramento submersa, medidores de nível e paredes de concreto são devastadores (SANTOS et al., 2012; DARRIGRAN & DAMBORENEA, 1999, BOLTOVSKOY et al., 2015c).

Após a invasão do mexilhão-dourado, foram adotadas metodologias para a reparação das turbinas, para isto, fez-se necessário a paralização da mesma para que fosse feita a manutenção na usina hidrelétrica de Itaipu, gerando custos diários de US\$ 1 milhão (COLLYER, 2007). Os danos causados em uma usina hidrelétrica de 120 MW, com três unidades geradoras, pode ter custos diários de R\$ 40.000,00 devido à parada de máquinas, somado aos custos para manutenção dos equipamentos e remoção das incrustações (NETTO, 2011).

Os setores de captação, tratamento e distribuição de água também enfrenam a problemática com o entupimento de válvulas, bombas e grades, que afetam diretamente a

distribuição de água para as estações de tratamento, além de gerarem resíduo orgânico ocasionado pela morte do mexilhão-dourado durante o tratamento da água (MANSUR et al., 2003).

Atividades relacionadas a aquicultura e a pesca são afetadas economicamente pelo molusco, devido ao acúmulo do mexilhão-dourado nos tanques-rede e demais superfícies ocasionam a deterioração do material, da qualidade da água, mortandade de peixes e diminuição da vida útil dos equipamentos, prejudicando empreendimentos aquícolas (OLIVEIRA et al., 2014). Na pesca, o mexilhão-dourado causou a diminuição do junco (*Juncaceae*), que constitui um berçário para as espécies de peixes locais (Moraes, 2012).

1.5 MÉTODOS DE CONTROLE

O controle populacional do mexilhão-dourado é focado principalmente em instalações industriais (DARRIGRAN e DAMBORENEA, 2009). Alguns métodos de controle do mexilhão-dourado estão sendo empregadas em países da Europa, Estados Unidos da América, Canadá, China, entre outros, como: o controle físico feito por meio de remoção mecânica, através da raspagem ou por bombas de alta pressão (OLIVEIRA et al., 2014); ondas sonoras, radiação UV, utilização de campo magnético para inibir o assentamento de larvas de mexilhão (CLAUDI; OLIVEIRA, 2015a); corrente elétrica para imobilização de larvas em condições de fluxo (KATSUYAMA et al., 2005) e turbulência criada pela passagem de água por placas perfuradas (XU et al., 2013). Além dos métodos de controle químicos utilizando revestimentos anti-incrustantes (BERGMANN et al., 2010a, 2010b); sem biocidas e o com a utilização de revestimentos contendo biopesticidas e os ajustes de pH utilizando Hidróxido de Sódio (BERGMANN et al 2010a, 2010b; ZURITA, 2012).

Outras estratégias vêm sendo adotadas para o controle de pragas bioinvasoras como esses moluscos. Dentre elas pode-se destacar a utilização de microrganismos vivos que são capazes de produzir diversas substâncias naturais incluindo antibióticos e enzimas para aplicações industriais e biopesticidas (MOLLOY et al. 2013). O uso de produtos oriundos dos metabólicos microbianos também tem um registro claro de sucesso comercial e segurança ambiental, no controle de pragas de invertebrados na América do Norte e mundialmente (RODGERS, 1993). No Brasil, não existem experiências de campo tampouco produtos registrados para o controle biológico do mexilhão-dourado.

1.6 PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE COMERCIAL

1.6.1 Interesse ambiental

O crescimento industrial nos mais diversos âmbitos tem gerado grande quantidade de resíduos, denotando um problema, principalmente, ambiental. Com o propósito de reduzir esses impactos ambientais, muitas espécies microbianas têm sido alvo de investigações e utilizadas em processos industriais. O interesse por esses organismos deve-se à capacidade dos mesmos de permitir a produção de moléculas com características químicas específicas em altas concentrações, tornando o campo da bioprospecção promissor (OLIVEIRA et al., 2006).

Por ser considerado fonte de enzimas, os microrganismos são de grande interesse no uso industrial e segundo Zimmer et al. (2009), características enzimáticas como a grande quantidade de produto em um tempo relativamente curto, independência ambiental e gasto reduzido no uso de matéria prima são atrativas para a indústria. Setores industriais como a produção de detergentes, bebidas, alimentos e de ração são grandes consumidoras de enzimas (MOURA et al., 2021). A exemplo desses microrganismos estão os polihidroxicanoatos, são bioplásticos que podem ser produzidos utilizando matérias-primas renováveis ou residuais industriais (REIS et al., 2021; MARGARIDO et al., 2021), como solução para produtos de origem petroquímicos não degradáveis, que normalmente poluem os corpos hídricos marinho e de água doce.

Produtos industriais que consigam controlar pragas como o caso do mexilhão-dourado ainda não são datados, no entanto, segundo Pereira (2014) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2020), as informações a esse respeito ainda estão a nível de bioensaio. Nesse patamar, foram avaliadas formulações comerciais de agentes microbianos como Tobac® contendo *Bacillus thuringiensis sv israelenses* sorotipo H-14, Vectobac® com *Bacillus thuringiensis sv israelensis*, e Vectolex® utilizando ativos de *Bacillus sphaericus*.

Enquanto na aquicultura, microrganismos como as bactérias nitrificantes são capazes de auxiliar em problemas como a alta taxa de renovação de água, pois a água do cultivo é rica em bases nitrogenadas como amônia, que em determinada concentração é tóxica para os animais de cultivo (QUEIROZ; BOEIRA, 2007) e o uso de bactérias nitrificantes, permite maior tempo de uso da água, logo, sem a necessidade de renovar grande quantidade de água e conseqüentemente reduz o nível de efluentes que seria descarregado no meio ambiente (ANDRADE et al., 2010). Sabendo dessas condições, a indústria dispõe no mercado produtos como iniciadores de bactérias. Um processo bastante conhecido quando os microrganismos são

utilizados para diminuir a carga poluentes ambientais é a biorremediação.

1.6.2 Biorremediação

A biorremediação é um processo no qual são utilizados organismos vivos como plantas, microrganismos e suas enzimas, objetivando controlar ou remediar os contaminantes ambientais (PEREIRA; FREITAS, 2012; LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019), para tanto, esses organismos podem degradar metabolicamente os poluentes e transformá-los em substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade (PEREIRA; FREITAS, 2012), reduzindo dessa forma, a concentração destes em ambientes como o terrestre e aquático (MALLMANN et al., 2019).

Alguns desses organismos com poder de biorremediação são as bactérias, fungos filamentosos e as leveduras (CARNEIRO; GARIGLIO, 2010), que em sua maioria estão atrelados na biorremediação de metais pesados provenientes de efluentes industriais. A exemplos desses organismos encontram-se a levedura *Saccaromyces cereviseae* e os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccaromyces* e *Trichoderma* (KUREK; CZOBAN; BOLLAG, 1982; GADD; WHITE, 1989) e os gêneros de bactéria *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, (MANDRI; LIN, 2007).

O sucesso do processo de biorremediação está associado quanto à natureza do mesmo, podendo ser *in situ* e *ex situ* (quando a biorremediação pode ser realizada no mesmo local e quando há a necessidade do transporte do matéria contaminado para o local de tratamento, respectivamente) (MARIANO, 2006; LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019) e também está atrelado à compreensão das variáveis ambientais, como pH, temperatura, oxigênio, umidade que possam permitir o crescimento do microrganismo e da atividade microbiana (ROSA; TRIGUIS, 2006; MENEGHETTI, 2007).

Outros organismos também vêm ganhando espaço no cenário da biorremediação, tais como moluscos bivalves, pois são conhecidos por sua capacidade de filtração e bioacumulação e com isso, são grandes indicadores de qualidade ambiental (LIMA; BENEDITTO; FRANCO, 2022). Esses moluscos podem, ainda, postular como biorremediadores, na aquicultura, pois de acordo com Pereira (2007), moluscos como as ostras possuem a capacidade de acelerar a biodegradação de compostos orgânicos, pois podem filtrar fitoplâncton, zooplâncton, bactérias e microalgas. Esse processo de filtração pode reduzir a carga de nutrientes e conseqüentemente

evitar/remediar a eutrofização do ambiente (PEREIRA et al., 2007).

Nos estudos de Modesto et al. (2010), foi observado o efeito da biorremediação de *Crassostrea rhizophorae* no tratamento de efluentes provenientes do cultivo de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*. Enquanto que, Jaiswal et al. (2014), isolou 8 culturas microbianas de um bivalve comestível e percebeu que a bactéria *Staphylococcus arlettae* possui potencial para biorremediação por ser resistente a produtos químicos. Essas pesquisas demonstram que a biorremediação é uma solução para os impactos ambientais e possui uma gama de organismos com tal potencial e ainda são necessários mais estudos, além disso, os microrganismos também podem ser aproveitados em outros requisitos, como o probiótico.

1.6.3 Probióticos

Os microrganismos probióticos são aqueles que quando administrado em quantidade correta proporciona benefícios ao hospedeiro. De forma geral, atuam no intestino, colonizando-o e competem com bactérias patogênicas e outros organismos, dessa forma, a proliferação de bactérias probióticas é maior que as bactérias patogênicas, tornando o intestino mais saudável e com capacidade potencializada para absorção de nutrientes (REUTER, 2001; RAMLUCKEN et al., 2021). No entanto, para que um microrganismo seja considerado probiótico, ele deve atender requisito, como o citado por Reuter (2001): devem ser capazes de atravessar a barreira estômago-duodeno em um estado viável e se multiplicar no local de destino no intestino e ser capazes de produzir metabólitos antagônicos contra uma microflora saprófita dominante, existindo uma competição.

Os probióticos sempre estiveram presentes na alimentação humana, principalmente, através dos laticínios (PANGHAL et al., 2018; DIEZ-ECHAVE et al., 2021). No entanto, a utilização desses microrganismos vai além do âmbito alimentar humano, permeando como grande ferramenta na criação de aves, suínos e na aquicultura (RIBEIRO; COSTA; LOGATO, 2008; VIEIRA; PEREIRA, 2016). A introdução desses microrganismos na aquicultura está ligada aos gargalos enfrentados por esse setor, principalmente com enfermidades e os problemas relacionados ao uso indiscriminado de quimioterápicos e antibióticos como o aumento da resistência de bactérias patogênicas que não respondem ao tratamento convencional (ELALA; RAGAA, 2015; HINDU et al., 2019). Para Pandiyan et al. (2013), a utilização de probióticos na aquicultura é uma prática importante para prevenção de doenças.

No entanto, os microrganismos usados como probióticos na aquicultura além de exercer boa atividade microbiana, devem ser seguros não apenas para o animal de cultivo, mas também para o meio no qual estão inseridos e também para os seres humanos (SILVA et al.,

2016). As bactérias probióticas mais utilizadas na aquicultura são as bactérias ácido-láticas, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp. (JATOBÁ et al., 2008; AZEVEDO et al., 2016)

De acordo com La-Fuente; Miranda; Faúndez (2015), apesar de poucos estudos sobre a infecção de larvas e juvenis de moluscos por bactérias patogênicas no cultivo, quando confirmada a infecção, causa alto nível de mortalidade. Entre esses organismos patogênicos estão *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus* e *Vibrio parahaemolyticus* (LA-FUENTE; FAÚNDEZ, 2019). Enquanto nos estudos de Gómez-Gil; Roque; Turnbull (2000) e de Lim et al. (2011) e La-Fuente; Faúndez (2019), descrevem que bactérias benéficas atuando como probióticos contra bactérias patogênicas, exercem atividade inibidora de patógenos e melhoram a condição nutricional de moluscos de cultivo.

1.7 MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTURA: Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)

Os estudos sobre as populações bacterianas que compõem a microbiota de diversos organismos vêm evoluindo com o passar dos anos. Os métodos utilizados para identificar e quantificar as diferentes populações microbianas, que compunham a microbiota animal, eram dependentes de meios de cultura (CARNEVALI et al., 2006; GHOSH; SINHA; SAHU, 2008; MERRIFIELD et al., 2009; MERRIFIELD et al., 2011; RINGØ et al., 2018). No entanto, estima-se que somente 0,1 a 10% dos microrganismos que compõem a comunidade microbiana sejam cultiváveis (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998).

Mais recentemente, os estudos têm feito uso do Sequenciamento de Alto Rendimento (HTS - *high-throughput sequencing*) para traçar o perfil da microbiota intestinal através da construção de extensas bibliotecas de genes, permitindo assim maior conhecimento sobre a mesma (ZHOU et al., 2014).

Conhecer detalhadamente a microbiota de organismos aquáticos, os diferentes grupos que a compõem, compreender sua composição filogenética e seu potencial metabólico, é fundamental para compreender as necessidades metabólicas dos animais (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015).

A redução no custo e no tempo de execução desta análise, o desenvolvimento de máquinas de sequenciamento cada vez mais eficientes e o uso de novas metodologias de bioinformática, estão tornando o uso desta ferramenta mais frequente no preenchimento da lacuna taxonômica existente e na compreensão do perfil funcional dos grupos bacterianos que formam a microbiota (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015). A análise metagenômica, com

as suas subdivisões: metatranscriptômica (análise dos genes transcritos), metaproteômica (análise das proteínas expressas pelos diferentes grupos bacterianos) e metabolômica (análise dos metabólitos produzidos pelos distintos grupos bacterianos); auxiliam na compreensão da relação entre microbiota e funções fisiológicas dos hospedeiros (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015).

Com a utilização da técnica HTS, conceitos da ecologia, como: riqueza, abundância e diversidade, vêm sendo aplicados no estudo da microbiota intestinal de diversas espécies aquícolas. O estudo da riqueza populacional fornece a quantidade de espécies ou táxons diferentes que compõem a microbiota intestinal. O índice Chao1 é um estimador de riqueza que estima o número real de táxons da microbiota levando em consideração também as espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras (COLWELL; CODDINGTON, 1994). A abundância fornece a quantidade de unidades taxonômicas pertencentes a um determinado grupo. Através de um gráfico de colunas colorido, consegue-se observar claramente a porcentagem de determinado táxon dentro da microbiota intestinal. O índice que a representa é denominado unidade taxonômica organizacional, do inglês *Operational Taxonomic Unit* (OTU). Já a diversidade, seria a combinação da quantidade de espécies (riqueza) e suas abundâncias relativas. Um dos índices que a representa é o Shannon-Wiener que assume que os microrganismos seriam coletados aleatoriamente de uma grande e infinita população, e que todas as espécies estariam representadas em uma única amostra (DIAS, 2004).

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Caracterizar a microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente na região do alto rio Uruguai (Santa Catarina, Brasil).

1.8.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a microbiota presente no *L. fortunei* encontrado em diferentes reservatórios de usinas hidrelétricas do estado de Santa Catarina através de análise metagenoma pelo Sequenciamento de Alto Rendimento;
- Identificar na microbiota digestiva do *L. fortunei* a presença de microrganismos possivelmente nocivos à saúde humana e a de peixes;
- Identificar a microbiota digestiva deste invasor e caracterizar a sua estrutura em diferentes estações do ano.

1.9 ESTRUTURA DO TRABALHO

A tese possui dois artigos que serão submetidos a revista *Science of the Total Environment*.

2 ARTIGOS

2.1 ARTIGO 1

Análise da diversidade microbiana no molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em diferentes reservatórios catarinenses, Sul do Brasil

Tamiris Henrique Ferreira¹, Lúvia Souza Sá¹, Paula Brando de Medeiros¹, Kennya Addam¹, Bruno da Silva Pierri¹, Jacó Joaquim Mattos², Alex Pires de Oliveira Nuner³, Grasiela Fagundes Minatto Cardoso⁴, Maurício Laterça Martins¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹

¹ AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

² LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³ LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Rodovia Francisco Thomaz dos Santos, 3532, CEP 88066-260, Florianópolis, SC, Brasil

⁴ Engie Brasil Energia S/A, Rua Paschoal Apóstolo Pítsica, 5064, 88025-255, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi identificar a microbiota digestiva do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) para detectar a presença de microrganismos oriundos de efluentes e possivelmente nocivos à saúde humana e a de peixes. As amostragens de *L. fortunei* foram em cinco reservatórios de usinas hidrelétricas (UHE), localizadas na região do alto rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil. Em cada um dos reservatórios foram amostrados três pontos, para cada ponto 15 mexilhões foram submetidos a biometria e armazenados em caixas térmicas refrigerada (4,0 °C). Posteriormente, cada mexilhão foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada do divertículo digestivo e de porções do intestino, identificado e armazenado individualmente em microtubos e preservados a -20 °C. Após a extração DNA das bactérias presentes no material coleado, as amostras foram submetidas ao Sequenciamento de Alto Rendimento e análises de metagenômica. As análises de sequenciamento revelaram a presença de 16 Filos que englobaram 218 gêneros e 280 espécies de bactérias presentes no trato digestivo do mexilhão-dourado. Foi possível concluir que o *L. fortunei* presente nos reservatórios de UHE do alto Rio Uruguai possuem uma microbiota que se diferencia entre os pontos coletados, com variações de composição do trato digestivo.

Highlights

- Primeiro relato da utilizando sequenciamento de alto rendimento para caracterização da microbiota do trato digestivo do mexilhão-dourado.
- A microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* indica seu potencial como bioindicador ambiental.
- Variação da microbiota digestiva do mexilhão-dourado em diferentes localidades.

2.1.1 Introdução

O mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* é um molusco bivalve exótico no Brasil, de origem Asiática, que possui grande capacidade de reprodução, dispersão e fixação (IPPOLITI, 2018). Originária do sul da China (MORTON, 1973; XU, 2015), essa espécie invasora foi acidentalmente disseminada em vários países do mundo como Camboja, Vietnã, Laos, Tailândia, Coreia do Sul e Japão (MORTON, 2010; ITO, 2015; XU, 2015). Na América do Sul, estudos relatam a introdução da espécie pela Argentina através de águas de lastros de navios (DARRIGRAN E MANSUR, 2009; OLIVEIRA et al., 2015), e atualmente *L. fortunei* está distribuído nas principais bacias hidrográficas brasileiras (HERMES-SILVA et al., 2021).

Os bivalves de maneira geral, alimentam-se de plâncton, microrganismos e matéria orgânica em suspensão presentes na água, por meio de filtração (BARNES, 1990), sendo que a taxa de filtração do mexilhão-dourado está entre as mais altas registradas para bivalves (SYLVESTER ET AL., 2006). A espécie apresenta resistência a metais pesados, organoclorados e toxinas, e pode facilmente acumular esses compostos, causando a biomagnificação na cadeia alimentar (DARRIGAN; COPPOLA, 1994), bem como das bactérias presentes na água.

As infecções bacterianas estão entre as principais doenças transmitidas pela água e pelo pescado (MADIGAN et al., 2016), sendo que os métodos convencionais para a detecção de bactérias dependem do cultivo em meios sólidos com composição que favoreça o crescimento de um microrganismo específico (BAI et al., 2010). Esses métodos são baratos e permitem a avaliação qualitativa e quantitativa de microrganismos, porém são demorados e estima-se que somente 0,1 a 10% dos microrganismos que compõem a comunidade microbiana sejam cultiváveis ou meio dependente (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; FENG, 2001).

Em contraste aos métodos meio dependentes, os baseados na técnica com o método baseado em cultura de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o mais rápido, sensível, específico e amplamente utilizado na detecção de bactérias, o que tem possibilitado o

aprimoramento dos estudos das comunidades bacterianas presentes em organismos, através do mapeamento completo da comunidade bacteriana (POSTOLLEC et al., 2011). O método independente de cultura conhecido como Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR) revolucionou a microbiologia por meio do desenvolvimento de novas tecnologias, que permitiu o sequenciamento do perfil microbiano a partir da amplificação do gene 16 S do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal (SOLIERI et al., 2013; MAYO et al., 2014).

O SAR é uma ferramenta valiosa para a triagem de uma ampla variedade de bactérias, incluindo as patogênicas e as de origem fecal, podendo ser aplicada em uma etapa inicial para identificar o risco à saúde humana e priorizar locais para avaliação adicional com métodos mais específicos (VADDE et al., 2019).

Portanto, a fim de se ampliar o conhecimento da comunidade bacteriana presente em *L. fortunei*, o objetivo do presente estudo foi identificar a microbiota digestiva deste invasor em diferentes reservatórios de usinas hidrelétricas, na região do alto Rio Uruguai, bem como, a presença de microrganismos possivelmente nocivos à saúde humana e a de peixes.

2.1.2 Material e Métodos

2.1.2.1 Local de coleta

As amostragens de *L. fortunei* foram realizadas em cinco reservatórios de usinas hidrelétricas (UHE) localizadas na região do alto rio Uruguai (Santa Catarina, Brasil). Em cada um dos reservatórios foram amostrados três pontos: CN1, CN2 e CN3 no reservatório da UHE Campos Novos, BG1, BG2 e BG3 no reservatório de UHE Barra Grande, MA1, MA2 e MA3 no reservatório de UHE Machadinho, IT1, IT2 e IT3 no reservatório de UHE Itá, e FC1, FC2 e FC3 no reservatório da UHE Foz do Chapecó. Entretanto, algumas amostras falharam nas verificações de qualidade e desconsideramos as dos pontos CN1, CN3, IT1 e FC1 pois não puderam ser analisadas (Tabela suplementar e 1 Figura 4).

2.1.2.2 Armazenamento e Preparo das Amostras

Mexilhões adultos, com comprimento médio de $2,92 \pm 0,12$ cm (Tabela 1), foram coletados nas margens de cada ponto amostral em profundidades de até 1,0 m, em setembro/2019.

Foram coletados 15 mexilhões para cada ponto, que foram submetidos a biometria e armazenados em caixas térmicas refrigerada (4,0 °C). Posteriormente, cada mexilhão foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada do divertículo digestivo e

de porções do intestino de *L. fortunei*. Esse material foi identificado e armazenado individualmente em microtubos livres de ácidos ribonucleicos (RNase) e ácidos desoxirribonucleicos (DNase), que foram preservados a -20 °C e transportados para o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Durante as coletas foram aferidos os parâmetros de qualidade de água, incluindo temperatura, pH e a concentração de oxigênio dissolvido em cada ponto de coleta (Tabela 1).

Tabela 1 - Comprimento dos mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) e temperatura (°C), pH e concentração de oxigênio dissolvido (mg l⁻¹), amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).

Ponto de coleta	Comprimento (cm)*	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)
CN2	2,63 ± 0,28	18,7	6,75	9,00
BG1	2,90 ± 0,45	17,5	6,69	8,30
BG2	3,10 ± 0,45	17,5	6,69	8,30
BG3	3,00± 0,45	17,5	6,69	8,30
MA1	2,92 ± 0,19	20,8	6,65	9,25
MA2	2,67 ± 0,16	18,6	6,63	8,74
MA3	2,88 ± 0,20	19,5	6,64	8,78
IT2	2,84 ± 0,13	22,0	6,77	9,50
IT3	3,32 ± 0,36	21,0	7,15	9,30
FC2	3,17 ± 0,30	18,7	7,05	7,91
FC3	2,73± 0,34	20,5	7,01	8,91

Fonte: Elaborado pelo autor
*n=15 (média ± desvio padrão)

2.1.2.3 Extração de DNA

Para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das bactérias presentes no material coletado, foram utilizadas 200 mg da porção que compreendia os divertículos digestivos e o intestino dos mexilhões coletados (*pools* de cinco mexilhões para cada ponto de coleta), utilizando o kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha, DE), seguindo-se as especificações do fornecedor. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop*™ 1000 (*Thermo Scientific* DE, US) e mantidas em concentração acima de 100 µg µl⁻¹.

2.1.2.4 Amplificação da PCR

Após a extração do DNA, as amostras foram enviadas à empresa MacroGen® para a análise metagenômicas. Para tal, foi realizado a amplificação da região do gene 16S do ácido

ribonucleico ribossomal (rRNA) das regiões preservadas V3 e V4.

2.1.2.5 Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)

No sequenciamento dos dados utilizou-se a tecnologia *Illumina* SBS, que marca os nucleotídeos por fluorescência quando estes se ligam a fita complementar em cada ciclo. As sequências com ruído foram removidas e as leituras representativas restantes dos *clusters* foram agrupadas usando o algoritmo complexo em *Operational Taxonomy Units* (OTUs), através do ajuste rápido de comprimento de leituras curtas (FLASH). As leituras foram agrupadas com 100% de identidade (ID) usando *CD-HIT-DUP* em um único arquivo. As OTUs foram coletadas usando um filtro de qualidade para garantir 97% de ID no nível da espécie. Para o sequenciamento, foi utilizado o alinhamento mínimo de 300 pb e com 100 k de leituras por amostra. As sequências foram analisadas usando o *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME).

2.1.2.6 Análises estatísticas

Foi realizada de acordo com a metodologia de Caporaso et al. 2010, através do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) onde as UTOs criadas foram relacionadas aos seus táxons correspondentes através da ferramenta “*assign_taxonomy.py*” comparadas com o banco de dados *Greengenes* (<http://qiime.org>). Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana nos períodos amostrados, foi feita uma análise de rarefação α , os índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, através da ferramenta “*alpha_diversity.py*”, onde foram calculados o índice Cobertura de Sequenciamento, como $C = 1 - (S / n)$, onde S é o número de OTUs exclusivos e n é o número de indivíduos na amostra, que expressa o quanto a amostra representa o ambiente, em medida relativa. O índice de diversidade de Shannon, que leva em consideração o número e a uniformidade da distribuição das espécies, o índice de riqueza Chao1, que direciona a estimativa de riqueza Chao1 para uma definição de OTU e o índice *Inverse Simpson* ($H = - \sum_{i=1}^8 = 1s(pi \log_2 pi)$), onde s é o número de OTUs e pi é a proporção da comunidade representada pela OTU i . O diagrama de Venn foi projetado para determinar as OTUs bacterianas únicas e aquelas compartilhadas entre diferentes as estações do ano, através do programa *InteractiVenn* (www.interactivenn.net, HEBERLE et al., 2015).

2.1.3 Resultados

Um total de 573.111 leituras de rRNA 16S bacteriano foram geradas a partir de amostras do trato digestivos com bibliotecas de sequências de tamanho variando de 37.539 a

70.796 leituras. Com base no número total de leituras de OTU foi possível observar que todas as amostras apresentaram boa corretora (Tabela 2). Um total de 816 OTUs foram geradas, variando de 52 a 97 OTUs entre as amostras, conforme indicado pela riqueza de OTU, índices de Chao1 e Shannon (Tabela 2 e Figura suplementar 1B).

Tabela 2: *Operational Taxonomy Units (OTU), Chao1, Shannon, Inverse Simpson e Good's Coverage* estimadas nas amostras dos tratos digestivos de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).

Amostras	Read Count	OTU	Chao1	Shannon	Inverse Simpson	Good's Coverage
CN2	70.030	67	67	0,89	0,19	1,00
BG1	41.280	65	65	3,72	0,84	1,00
BG2	39.897	90	90	3,82	0,86	1,00
BG3	37.539	62	62	3,43	0,79	1,00
MA1	48.268	52	53	1,52	0,36	1,00
MA2	52.615	78	78	2,54	0,55	1,00
MA3	46.045	73	73	3,19	0,79	1,00
IT2	55.853	96	96	3,86	0,85	1,00
IT3	58.011	97	97	3,01	0,78	1,00
FC2	70.796	71	71	2,74	0,71	1,00
FC3	52.777	65	65	2,88	0,76	1,00

Fonte: Elaborado pelo autor

A abundância relativa da microbiota do trato digestivo e intestinal de *L. fortunei* foi maior no ponto IT3 (97 OTUs) e a menor no MA1 (53 OTUs), havendo variação entre os pontos coletados em diferentes reservatórios (Figura suplementar 1 A).

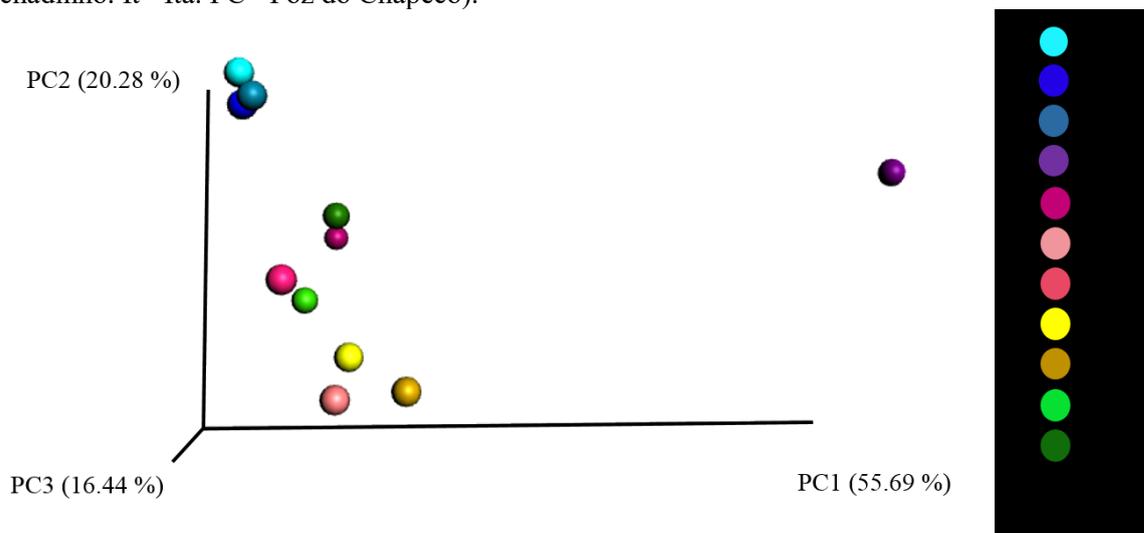
2.1.3.1 Similaridade das comunidades bacterianas

A análise hierárquica de agrupamento foi realizada para identificar a semelhança entre as diferentes amostras trato digestiva de *L. fortunei*. As semelhanças entre as composições da microbiota das amostras dos pontos de coleta foram ordenadas pela Análise Ponderada das Coordenadas Principais (PCoA), utilizando a distância métrica UniFrac Ponderada, sendo que os eixos PC1, PC2 e PC3 representaram 55,69 %, 20,28 % e 16,14 % da variabilidade total, respectivamente (Figura 1).

Quando as amostras foram comparadas entre si, as do reservatório de UHE Barra Grande (BG1, BG2 e BG3) distribuíram-se separadamente das demais, indicando composição bacteriana distinta (Figura 1). A diversidade analisada por PCoA também revelou que as amostras dos pontos de coleta FC3 e MA1 se agruparam separadamente, assim como as

amostras dos pontos MA3 e FC2, que apesar da semelhança, pertencem a reservatórios distintos (Figura 1). A amostra de UHE Campos Novos (CN2) esteve mais distante dos demais grupos, indicando que a comunidade bacteriana presente apresentou variações divergentes nas classificações de OTUs, quando comparada às demais (Figura 1).

Figura 1 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica *UniFrac* Ponderada, indicando a ordenação das comunidades microbianas presentes no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).

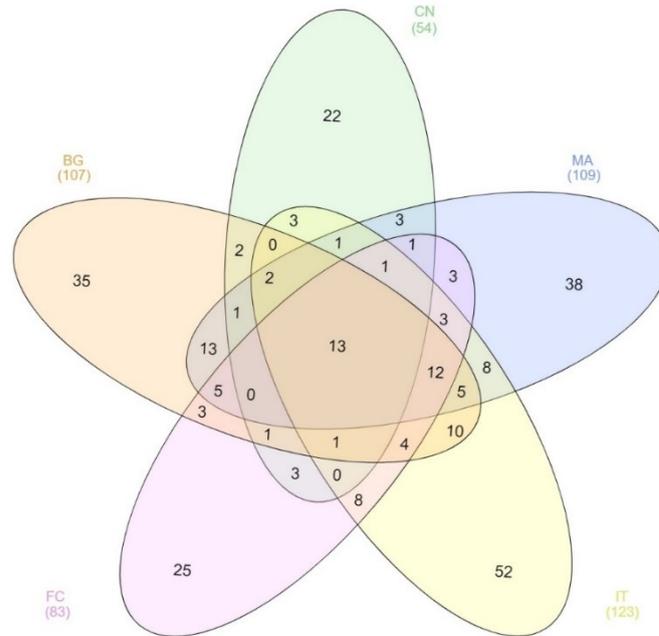


Fonte: Elaborado pelo autor

A análise dos fragmentos da região alvo do gene 16S rRNA envolveu, ainda, sua distribuição quantitativa em OTUs em nível de espécie, únicas ou compartilhadas, para construção do diagrama de Venn (Figura 2). Muitos dos microrganismos detectados são comumente encontradas no meio ambiente aquático, enquanto outros são cepas conhecidas por serem patógenos para peixes e humanos.

O diagrama de *Venn* mostrou que 13 OTUs (4,63 % do total) foram compartilhadas entre todas as amostras, ou seja, não sofreram influência determinante do ambiente onde foram coletadas.

Figura 2 - *Operational Taxonomic Units*, em nível de espécie, singulares e compartilhadas, da microbiota bacteriana presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). Cada elipse representa um conjunto de comunidades microbianas. A intersecção de duas ou mais elipses mostra o número de OTUs compartilhadas entre conjuntos. Os números fora da área de intersecção correspondem às OTUs que foram encontradas exclusivamente em mexilhões de um determinado reservatório.



Fonte: Elaborado pelo autor

As OTUs identificadas na intersecção das elipses de todos os pontos coletados nas amostras digestivas do *L. fortunei* foram *Enterobacter tabaci*, *Arenimonas maotaiensis*, *Loriellopsis cavernicola*, *Aciditerrimonas ferrireducens*, *Fimbrioglobus ruber*, *Parviterribacter kavangonensis*, *Streptomyces aomiensis*, *Methylocystis echinoides*, *Acinetobacter junii*, *Simkania negevensis*, *Klenkia marina*, *Beijerinckia indica* e *Methylocella palustris*.

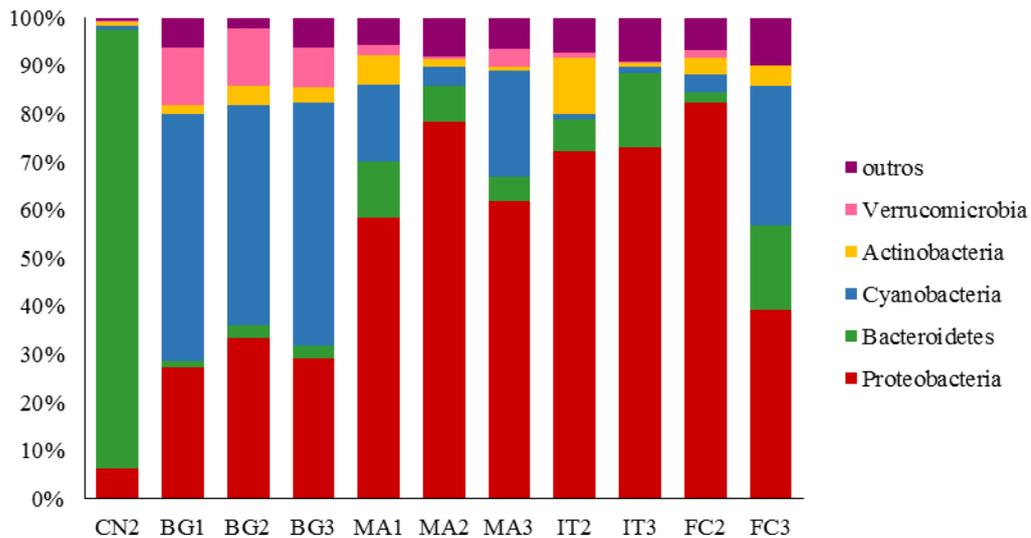
Em relação aos reservatórios, 52 OTUs (18,51 %) foram observadas somente no reservatório de UHE Itá, que apresentou o maior conjunto de bactérias exclusivas, enquanto 25 OTUs (7,83 %) foram encontradas somente em UHE Campos Novos, que apresentou menor quantidade de microrganismos (Tabela suplementar 2).

2.1.3.2 Microbiota bacteriana do trato digestivo de *Limnoperna fortunei*

As análises de sequenciamento revelaram a presença de 16 Filos que englobaram 218 gêneros e 280 espécies de bactérias presentes no trato digestivo do mexilhão-dourado. A classificação taxonômica da microbiota, com base no gene 16S rRNA, foi dominada por OTUs

de membros dos Filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia, formando a composição microbiana mais importante, com a maior abundância relativa, que constituiu 93,97% do conjunto de dados (Figuras 3 e 4).

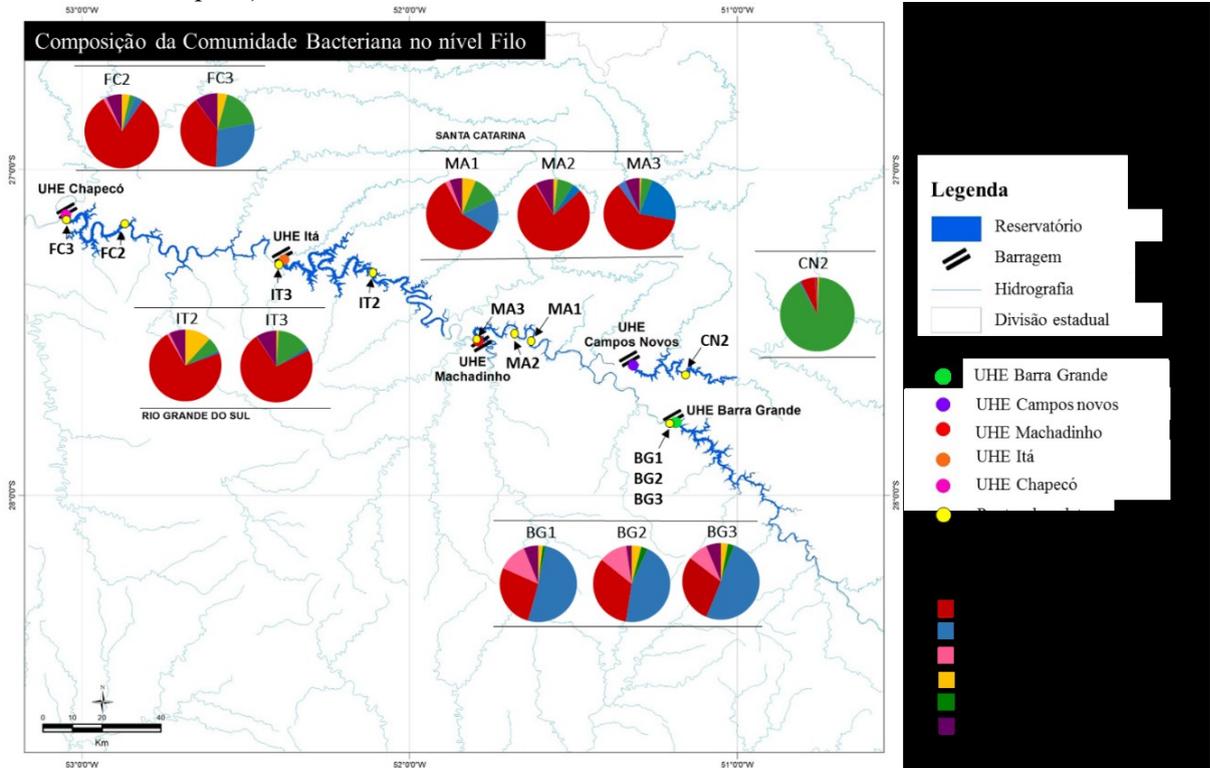
Figura 3 - Microbiota bacteriana (abundância relativa de OTU), em nível de Filo, presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).



Fonte: Elaborado pelo autor

O Filo Proteobacteria, com 49,98% de todas as leituras mapeadas, foi o mais abundante entre os encontrados na microbiota digestiva do *L. fortunei*, esteve presente em todos os grupos coletados e foi mais representativo na amostra do reservatório de FC2, compondo 82,25% da microbiota presente. O segundo Filo mais representativo foi Bacteroidetes (20,91%), que apesar de estar presente em todos os pontos dos reservatórios, apresentou maior concentração no ponto CN2, com abundância relativa de 91,12% da composição da microbiota para amostra do local (Figuras 5 e 6). O terceiro Filo mais representativo foi Cyanobacteria (16,75%), que apesar de estar presente em todos os reservatórios, foi mais representativo nas amostras do reservatório de UHE Barra Grande onde, no ponto BG1, compôs 51,21% da microbiota presente (Figuras 3 e 4).

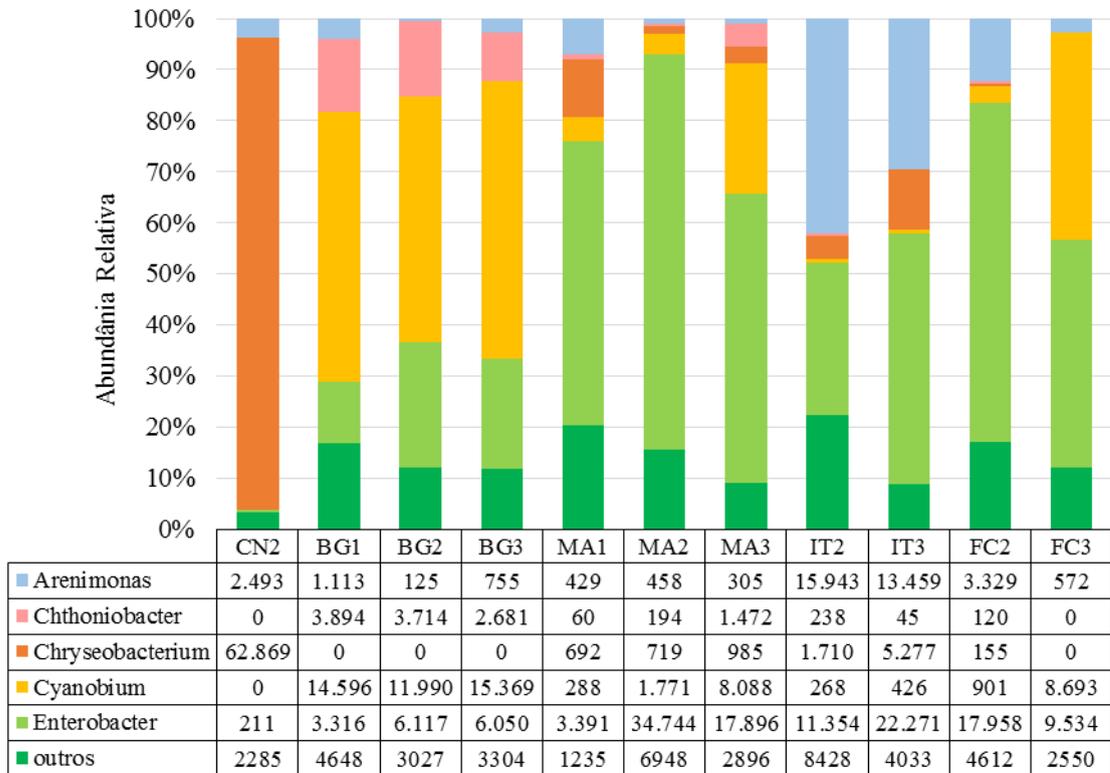
Figura 4 - Localização das barragens, pontos de coleta e gráficos de abundância relativa da composição taxonômica, por Filo, da microbiota bacteriana presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).



Fonte: Elaborado pelo autor

Com base na SAR, dentre os 218 gêneros identificados nas amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado, foi possível destacar os vinte gêneros de bactérias mais abundantes, representados em mapa de calor (Figura 6), no qual é possível observar a abundância relativa dos gêneros bacterianos. Os gêneros *Enterobacter* (32,34%), *Chryseobacterium* (17,63%), *Cyanobium* (15,19%), *Arenimonas* (9,49%) e *Chthoniobacter* (3,02%) apresentaram maior dominância (abundância relativa do total de OTUs nos sequenciamentos analisados) no trato digestivo de *L. fortunei* (Figura 6).

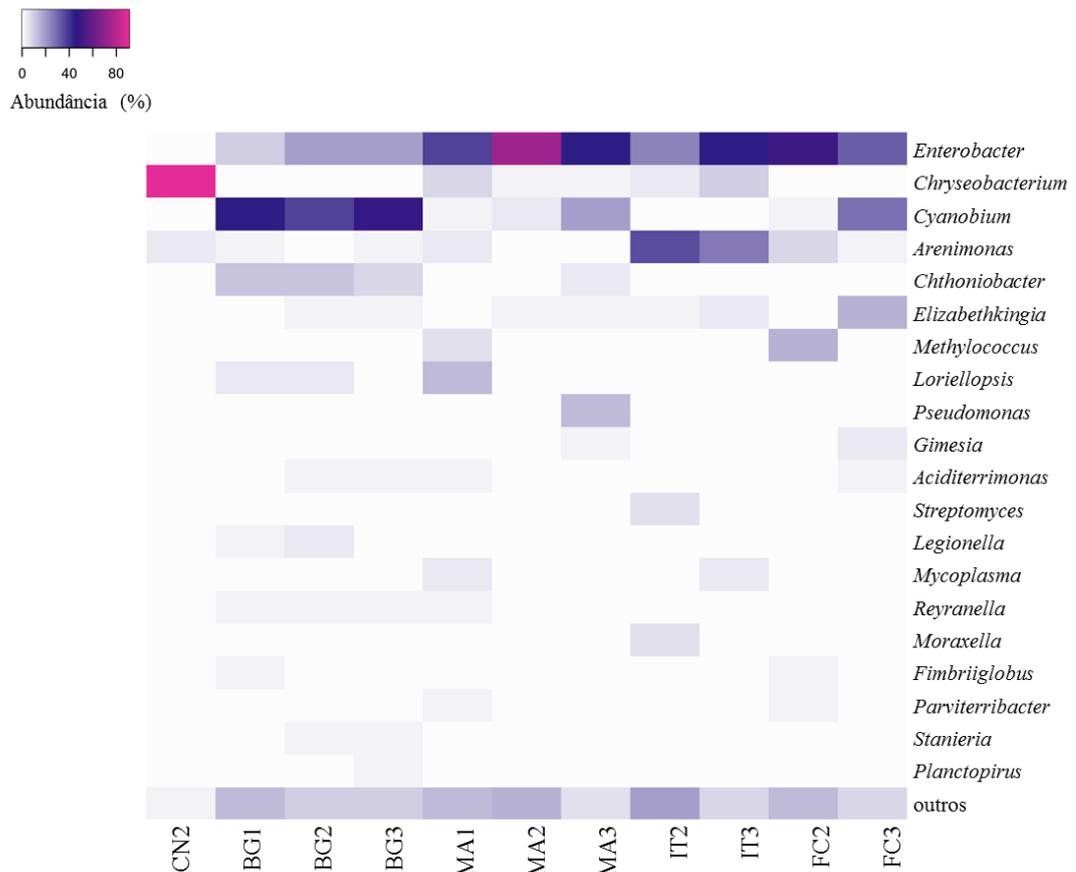
Figura 5 - Microbiota bacteriana (abundância relativa de OTU), em nível de gênero, presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os táxons do gênero *Enterobacter* nos pontos de coleta da UHE Machadinho, UHE Itá e UHE Foz de Chapecó foram mais abundantes, enquanto *Chryseobacterium* esteve menos distribuído entre os pontos de coleta, estando presente em 91% das OTUs dos sequenciamentos analisados em CN2 (Figura 6). A cianobactéria *Cyanobium*, assim como *Enterobacter*, esteve mais distribuída entre os pontos de coleta, mantendo maior abundância relativa nas amostras dos pontos BG1, BG2 e BG3 e ausente nas do CN2, ao contrário da cianobactéria *Loriellopsis*, que apesar de apresentar abundância relativa inferior, esteve presente em todos os pontos de coleta dos reservatórios (Figura 6 e Tabela Suplementar 3).

Figura 6 - Mapa de calor, para o nível de gênero, da microbiota digestiva presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó). Eixo x: identificação dos pontos de coleta das amostras; Eixo y: proporções de OTUs).



Fonte: Elaborado pelo autor

O sequenciamento da microbiota do trato digestivo de *L. fortunei* identificou diferentes Gêneros de bactérias, com *Elizabethkingia*, *Pseudomonas* e *Mycoplasma*, presentes entre os vinte microrganismos mais abundantes (Figura 6 e Tabela suplementar 4). Além disso, a análise sequenciou e identificou OTUs raras, e diversos Gêneros abundância relativa (menor que 1,00%), como *Dorea*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Aeromonas* (Tabela suplementar 4), que podem apresentar, em condições especiais, potencial zoonótico e/ou patogênico. No entanto, a baixíssima quantidade desses organismos, presentes em quantidades restritas e isoladas, sugere que esse potencial tende a não se realizar. Nesse sentido, ensaios específicos para constatação do potencial patogênico e estudos complementares de estabilidade e infectividade desses gêneros devem ser conduzidos para elucidar a questão.

2.1.4 Discussão

A composição da microbiota digestiva, bem como, a presença de microrganismos possivelmente nocivos à saúde humana e a de peixes, foram caracterizados e identificados pela primeira vez em *Limnoperna fortunei*. As comunidades microbianas do trato digestivo de *L. fortunei* variaram de acordo com o local, sugerindo que o aumento da flexibilidade microbiana está ligada ao ambiente que habitam e aos que estão em seu entorno. Embora existam estudos semelhantes para outras espécies de moluscos que fornecem evidências convincentes sobre a flexibilidade microbiana, estudos com *L. fortunei* ainda são escassos e carecem de abordagens experimentais mais detalhadas para determinar como a flexibilidade microbiana, bem como as baixas concentrações de microrganismos potencialmente patogênicos, pode interferir na saúde do homem e de peixes.

O conhecimento da microbiota intestinal de mexilhões de água doce pode ajudar a compreender como a estrutura da comunidade é constituída (ACEVES et al., 2018; WEINGARTEN et al., 2019). Como animais filtradores, sua microbiota intestinal pode ser particularmente sensível à variação ambiental (ACEVES et al., 2018; VAUGHN, 2018; WEINGARTEN et al., 2019). No presente estudo, os Filos dominantes no trato digestivo de *L. fortunei* foram Proteobacteria e Bacteriodetes, cujos membros têm morfologia muito variável e fisiologia versátil, o que lhes dá vantagem competitiva para sobreviver em diferentes nichos ecológicos, como solo (LAUBER et al., 2009), plantas (REDFORD; FIERER, 2009), água do mar (TEELING et al., 2012), água doce (PASCAULT et al., 2014), atmosfera (WHON, et al. 2012) e diferentes partes do corpo dos mamíferos (COSTELLO et al., 2009; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012).

Os Filos Proteobacter e Bacteriodetes também foram encontrados na composição da microbiota de outras espécies de molusco de água doce, como *Dreissena polymorpha*, que foi utilizada na avaliação da influência de águas e sedimentos na composição da sua microbiota (MATHAI et al., 2020); na composição da microbiota presente no reto das espécies *Solenia carinata*, *Sinohyriopsis cumingii* e *Sinanodonta woodiana* (LIU et al., 2020); e compoendo a microbiota presente no estômago de *Sinanodonta woodiana* (TAN; LONG, 2020).

A análise das coordenadas principais (PCoA) ordenou os diferentes pontos de coleta dos reservatórios de UHE de Foz de Chapecó (FC2 e FC3), UHE de Itá (IT2 e IT3) e UHE de Machadinho (MA1, MA2 e MA 3) em região próxima, o que mostra que existe similaridade entre eles.

As margens dos rios da região do alto rio Uruguai apresentam cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica intercaladas com zonas urbanas e rurais nas quais são desenvolvidas

intensas atividades cujas principais fontes de poluição são esgotos domésticos, efluentes industriais, efluentes da criação de suínos e aves, e efluentes agrícolas provenientes das lavouras (FRAG-RIO, 2011). Os Filos Proteobacteria e Bacteriodetes apresentaram abundância relativa representativa nesses pontos de coleta e a proximidade dos pontos FC3-MA1 e MA3-FC2 pode estar relacionada ao despejo de resíduos provenientes de esgotos, já que os reservatórios de Machadinho e Foz do Chapecó encontram-se próximo aos municípios de Chapecó e ao de Concordia, 5º município mais populoso da região Oeste e maior produtor de suínos e aves do estado de Santa Catarina, respectivamente (IBGE, 2021).

Já as amostras do trato digestivo dos mexilhões amostrados no reservatório da UHE Itá, que está situado entre os reservatórios de Machadinho e Foz de Chapecó, apresentaram maior diversidade e riqueza de espécies no ponto IT2. Este ponto de coleta está próximo ao Rio do Peixe, afluente do Rio Uruguai, que sofre grande influência das atividades econômicas dos municípios do entorno, como as provenientes da agricultura e da pecuária, além do intenso processo de erosão ocasionado pela ação antrópica.

Diferenças acentuadas na microbiota do trato digestivo foram mais evidentes nos níveis da base da classificação. Neste sentido, a abundância relativa com base nas OTUs das amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado mostrou *Enterobacter* (32,34%), do Filo Protobacteria, como o gênero mais abundante. Apesar deste gênero apresentar principalmente microrganismos que têm origem no solo e em plantas, também foi identificado, de forma ubíqua, em amostras fecais de humanos, suínos, aves e gado (VADDE et al., 2019). A presença desse gênero nos tratos digestivos de mexilhão-dourado indica que as fontes ambientais, como água e sedimentos, contribuem para a estrutura da comunidade microbiana do ambiente, sendo que a abundância relativamente alta reflete a contaminação biológica em cada local e, provavelmente, pode ser utilizado para monitorar a qualidade microbiana da água. Esses resultados corroboram com os obtidos através da comparação entre a microbiota presente em águas de um rio, sedimento e a do mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*), onde a elevada concentração de microrganismos de origem entérica no molusco demonstrou contaminação ambiental (MATHAI et al., 2020).

Diferentemente dos táxons *Enterobacter* e *Cyanobium*, que ocorreram de forma mais distribuída nos tratos digestivos do mexilhão-dourado de todos os pontos de coleta, o gênero *Chryseobacterium* (Filo Bacteriodetes), foi o segundo com a maior abundância relativa total (17,63%) entre os gêneros sequenciados.

Em CN2 foram encontrados 82% do total de OTUs de todos os sequenciamentos analisados formados por *Chryseobacterium*. Muitas das espécies pertencentes a esse gênero

foram encontradas associadas a plantas (YOUNG et al., 2005; PARK et al., 2006; BEHRENDT et al., 2007), e embora a relação entre *Chryseobacterium* e suas plantas hospedeiras não seja muito conhecida, ela pode ser considerada simbiótica, considerando sua frequente ocorrência em raízes de plantas ou rizosferas (KRAUSE et al., 2001; SHIN et al., 2007; RAMOS-SOLANO et al., 2008). Como o município de Campos Novos, maior produtor de soja do estado de Santa Catarina (IBGE, 2021), está localizado próximo ao ponto CN2, os processos erosivos decorrentes da atividade agrícola, e efluentes oriundos da intensa atividade agrícola, podem ter contribuído para concentração desse gênero, no ecossistema e conseqüentemente com a sua concentração nas amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado. Isso sugere que os mexilhões estão retendo seletivamente certos táxons no trato digestivo e que seu microbioma bacteriano intestinal não depende apenas das bactérias associadas às partículas que ingerem, como verificado em mexilhões de água doce das espécies *Cyclonaias asperata*, *Fusconaia cerina*, *Lampsilis ornata* e *Obovaria unicolor* (WEINGARTEN et al. 2019).

O mexilhão-dourado apresentou seletividade alimentar por cianobactérias, o que indica a preferência desse molusco por cepas tóxicas e sua resistência a cianotoxinas (GAZULHA et al., 2012^a; GAZULHA et al., 2012^b). *Cyanobium* representa risco à saúde em todo o mundo (DAS; DASH, 2018), e é o mais abundante dentre os gêneros pertencentes a Cyanobacteria, com 15,19% do total de OTUs entre todas as amostras onde foram detectadas. Esse gênero esteve mais evidente no trato digestivo de *L. fortunei* dos reservatórios de Barra Grande (BG1, BG2 e BG3) e Foz de Chapecó (FC3) e ausente em CN2, diferentemente de *Loriellopsis*, pertencente ao mesmo Filo, que apresentou abundância relativa mais baixa e esteve presente nas amostras de todos os pontos de coleta, o que sugere que a alta proporção de *Cyanobium* pode implicar em uma proporção microbiana transitória que foi absorvida durante o período de alimentação através da filtração da água de cada local amostrado. Microrganismos transitórios adquiridos do meio ambiente podem ser membros abundantes das comunidades intestinais dos animais (KING et al., 2012; PIERCE et al., 2016).

As cianobactérias podem ser absorvidas como alimento para bivalves, mas fornecem nutrição limitada, suficiente apenas para suporte às necessidades básicas de manutenção, sem envolver o crescimento dos organismos (AVILA-POVEDA et al., 2014). Além disso, não são consideradas parte da sua microbiota.

Mycoplasma é um dos gêneros comumente encontrados em organismos marinhos, incluindo bivalves (JANDA; ABBOTT, 2014; VEZZULLI et al., 2017; LASA et al., 2019), tendo sido associado a moluscos saudáveis (LASA et al., 2019), sendo dominante na glândula digestiva (MILAN et al., 2018). Esse gênero foi classificado entre os vinte mais abundantes que

compuseram a microbiota do trato digestivo do mexilhão-dourado, e é considerado um gênero de bactéria parasita, patogênicos, que se liga às brânquias de peixes de água doce, causando necroses (ADAN-KUBO et al., 2012). Espécies desse gênero podem desempenhar um papel benéfico na aptidão e no estado de saúde dos bivalves, embora seu papel dentro do hospedeiro ainda seja amplamente desconhecido (ROMERO et al., 2002; KING et al., 2012). Desse modo, a sua presença com abundância relativamente alta, pode ser tolerado pelo mexilhão-dourado presente nos reservatórios das usinas hidrelétricas do alto rio Uruguai, porém pode apresentar risco para ictiofauna.

Assim como nas amostras de mexilhão-dourado, relatadas neste estudo, *Pseudomonas* esteve presente na composição da microbiota do molusco invasor *D. polymorpha*, associados à poluição ambiental (WINTERS e al, 2010). Muitas espécies de *Pseudomonas* são patogênicas para humanos, animais e para organismos aquáticos (NIXON et al., 2001). As espécies de *Pseudomonas* foram descritas como um dos agentes infecciosos bacterianos mais comuns em peixes, e foram relatadas como causadoras de doenças relacionadas ao estresse em peixes de água doce (LÓPEZ et al., 2012; DEROME et al., 2016). A bioacumulação de *Pseudomonas* poderá interferir na saúde dos peixes da região do alto rio Uruguai, já que 22 espécies de peixes que ocorrem nessa região apresentaram *L. fortunei* na dieta (ÁVILA-SIMAS et al., 2019).

Resultados da amplificação por PCR do gene 16S rRNA, sequenciamento, comparação e análise filogenética, revelaram ainda a capacidade de identificar OTUs raras. Esta metodologia fornece uma representação da comunidade bacteriana e de espécies menos abundantes, e uma visão sobre a conservação de filótipos bacterianos, dentro de microhabitats e entre os hospedeiros individuais (SOGIN, et al. 2006; SUNAGAWA, et al., 2010).

As bactérias do gênero *Dorea* que estão presentes principalmente em fezes humanas (TARAS et al., 2002) e, *Streptococcus*, responsável por surtos de mortalidade em peixes (EL-NOBY et al., 2021), por infecções da cavidade bucal e endocardite infecciosa aguda em humanos (AAS, et al., 2005), apresentaram abundância baixa, porém podem vir a representar um risco para saúde (VADDE et al., 2019) caso seja constatada sua patogenicidade.

Entre as espécies de *Acinetobacter* e *Aeromonas* algumas são consideradas patógenos oportunistas, que causam gastroenterites (KHOSRAVI et al., 2015; LAUKOVA et al., 2018). *Acinetobacter* apresenta mais de vinte espécies, das quais poucas são consideradas patógenas (SHAMSIKHADEH et al., 2017), sendo *Acinetobacter junii* uma delas, que está associada a infecção do trato urinária (ABO-ZED et al., 2020). Essa bactéria e *Enterobacter tabaci*, que foi encontrada em estação de tratamento de águas residuais domésticas (MANOHARAN et al,

2020), estiveram presentes no trato digestivo do mexilhão-dourado de todos os reservatórios do alto Rio Uruguai.

Em nossos estudos, a presença de microrganismos com potencial zoonótico e potencial patogênico para humanos, foi detectada em baixíssimas porcentagens, possivelmente abaixo da concentração infecciosa provável, ainda que não tenham sido realizados testes de viabilidade e/ou infectividade. Alguns patógenos ocorrem naturalmente em ambientes distintos, enquanto a presença de outros está relacionada à contaminação de origem antrópica, o que indica a importância da adoção do biomonitoramento dessas áreas, pois as variações das condições ambientais, como a temperatura da água, a concentração de nutrientes, o pH, a carga de carbono orgânico dissolvido, a presença de doenças e a competição por espaço, têm o potencial de impactar os grupos bacterianos, a abundância de OTU e também podem contribuir para o aparecimento ou desaparecimento de algumas bactérias (HERNANDEZ-AGREDA, 2017).

Nossos resultados indicam que as fontes ambientais, águas residuais e sedimentos, podem contribuir para estruturar a comunidade microbiana do trato digestivo de *L. fortunei*, e apontam o potencial da espécie em refletir a contaminação biológica. No entanto, abordagens mais amplas são necessárias para compreender como as variáveis tempo, espaço, fatores bióticos e abióticos podem, simultaneamente, afetar a capacidade do *L. fortunei* de refletir a alteração da comunidade microbiana, e se a presença desses filtradores altamente invasivos têm implicações ecológicas para a saúde pública.

O presente estudo produziu não apenas conhecimento sobre microrganismos associados ao mexilhão-dourado, mas também sobre a influência que o ambiente por ele invadido pode ter sobre a modulação da sua microbiota, fornecendo uma descrição mais detalhada da microbiota do trato digestivo de *L. fortunei* com relação às comunidades bacterianas oriundas de efluentes.

2.1.5 Conclusões

De acordo com as nossas conclusões, o *L. fortunei* presente nos reservatórios de UHE do alto Rio Uruguai apresentam microbiota que se diferencia entre os pontos coletados, com variações de composição do trato digestivo.

2.1.6 Agradecimentos

À Engie Brasil Energia, Itá Energética, Energética Barra Grande, Campos Novos Energia, Foz do Chapecó Energia, financiadores desta pesquisa desenvolvida no âmbito do Programa de P&D regulado pela ANEEL (PD-00403-0043/2017); à Fundação de Amparo à

Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela Bolsa de Doutorado para T.H. Ferreira; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 306635/2018-6) e J.L.P. Mouriño (CNPq 301524/2017-3); a PhD J. Ribolli pela revisão do manuscrito e ao PhD. V. A. Pontinha (*in memoriam*) pela contribuição intelectual e auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa. Nenhum cientista faz ciência sozinho.

Colaboração dos autores

Tamiris Henrique Ferreira: Execução do experimento, análises, revisão bibliográfica e escrita.

Lúvia Souza Sá: Investigação e colaboração na análise de extração de DNA.

Paula Brando de Medeiros: Investigação e coleta de material biológico para análises.

Kennya Addam: Investigação e coleta de material biológico para análises.

Bruno da Silva Pierri: Auxílio nas análises de Bioinformática

Jacó Joaquim Mattos: Investigação e ajuste metodológico para extração de DNA das amostras.

Alex Pires de Oliveira Nuner: Investigação.

Grasiela Fagundes Minatto Cardoso: Investigação.

Maurício Laterça Martins: Investigação.

José Luiz Pedreira Mouriño: Investigação e revisão da escrita.

REFERÊNCIAS

AAS, Jørn A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.

ABO-ZED, Abdelrhman; YASSIN, Mohamed; PHAN, Tung. *Acinetobacter junii* as a rare pathogen of urinary tract infection. **Urology Case Reports**, v. 32, p. 101209, 2020.

ACEVES, Alison K. et al. Description and characterization of the digestive gland microbiome in the freshwater mussel *Villosa nebulosa* (Bivalvia: Unionidae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 84, n. 3, p. 240-246, 2018.

ADAN-KUBO, Jun et al. Molecular structure of isolated MvspI, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3050-3057, 2012.

AVILA-POVEDA, Omar Hernando et al. Evidence for accumulation of *Synechococcus elongatus* (Cyanobacteria: Cyanophyceae) in the tissues of the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). **Tissue and Cell**, v. 46, n. 5, p. 379-387, 2014.

DE AVILA-SIMAS, Sunshine; REYNALTE-TATAJE, David Augusto; ZANIBONI-FILHO,

Evoy. Fish predators of the golden mussel *Limnoperna fortunei* in different environments in a south american subtropical river. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, 2019.

BAI, Sulan et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 983-990, 2010.

BARNES, R. D. (1990). **Zoologia dos Invertebrados**. 4.ed. SãoPaulo. Editora Roca. 1029.

BEHRENDT, Undine et al. *Chryseobacterium luteum* sp. nov., associated with the phyllosphere of grasses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1881-1885, 2007.

CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

COSTELLO, Elizabeth K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009.

DARRIGRAN, G. et al. Introdução a Biologia das Invasões o Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controlo. **CUBO Editora, São Carlos**, 2009.

DAS, Surajit; DASH, Hirak Ranjan (Ed.). **Microbial diversity in the genomic era**. Academic Press, 2018.

DEROME, Nicolas et al. Fungal secondary invaders of fish. In: **The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic**. Springer, Cham, 2016. p. 109-126.

A EL-NOBY, Gamal et al. *Streptococcus*: A review article on an emerging pathogen of farmed fishes. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 25, n. 1, p. 123-139, 2021.

VÁZQUEZ-BAEZA, Yoshiki et al. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. **Gigascience**, v. 2, n. 1, p. 2047-217X-2-16, 2013.

FENG, P. (2001). Advanced techniques in food microbiology **Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers ASM Press**, Washington, DC.

FRAG-RIO, (2011). **Desenvolvimento Metodológico e Tecnológico para Avaliação Ambiental Integrada Aplicada ao Processo de Análise de Viabilidade de Hidrelétricas – RELATÓRIO FRAG-RIO, Relatório Técnico, MINUTA. ETAPA 1.**

GAJARDO, Karina et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

GAZULHA, V. et al. Grazing impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on single-celled, colonial and filamentous cyanobacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 33-39, 2012b.

- GAZULHA, V. et al. Feeding behavior of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) under exposure to toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 41-49, 2012a.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, Roger W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1998.
- HERMES-SILVA, Samara et al. *Limnoperna fortunei*-Atualização da distribuição geográfica nas bacias hidrográficas brasileiras e mapeamento da ocorrência regional na bacia do Alto Rio Uruguai. **Biota Neotropica**, v. 21, n. 3, 2021.
- HERNANDEZ-AGREDA, Alejandra; GATES, Ruth D.; AINSWORTH, Tracy D. Defining the core microbiome in corals' microbial soup. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 125-140, 2017.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agro 2017**. Brasil: IBGE, 2021. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ITO, K. (2015). Distribution and spread of *Limnoperna fortunei* in Japan. In: BOLTOVSKOY, D. (Ed.) *Limnoperna fortunei* - The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel. **Switzerland: Springer**, 321-332.
- JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 293-312, 2014.
- KING, Gary M. et al. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e51475, 2012.
- KRAUSE, Matthew S.; MADDEN, Laurence V.; HOITINK, Harry AJ. Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of *Rhizoctonia damping-off* of radish and *Rhizoctonia crown and root rot* of poinsettia. **Phytopathology**, v. 91, n. 11, p. 1116-1123, 2001.
- LASA, Aide et al. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. **Environmental microbiology**, v. 21, n. 12, p. 4548-4562, 2019.
- LAUBER, Christian L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.
- LEDERBERG, Joshua; MCCRAY, Alexa T. Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. **The scientist**, v. 15, n. 7, p. 8-8, 2001.
- LI, Zhikun; ZHU, Honghui. *Chryseobacterium vietnamense* sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt_4, p. 827-831, 2012.

LIU, Xiongjun et al. Comparative analysis of gut microbiota diversity in endangered, economical, and common freshwater mussels using 16S rRNA gene sequencing. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 21, p. 12015-12023, 2020.

LOPEZ, Jose R. et al. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt_4, p. 874-882, 2012.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MANOHARAN, Ranjith Kumar et al. Antibacterial and photocatalytic activities of 5-nitroindole capped bimetal nanoparticles against multidrug resistant bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, p. 110825, 2020..

MATHAI, Prince P. et al. Water and sediment act as reservoirs for microbial taxa associated with invasive dreissenid mussels. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 134915, 2020.

MAYO, Baltasar et al. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. **Current genomics**, v. 15, n. 4, p. 293-309, 2014.

MILAN, Microbiota et al. Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 195-207, 2018.

MORTON, B. Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia: Mytilacea). **Malacologia**, v. 12, p. 265-281, 1973.

MORTON, Brian et al. Colonization of Asian freshwaters by the Mytilidae (Bivalvia): a comparison of *Sinomytilus harmandi* from the Tonle-Sap River, Phnom Penh, Cambodia, with *Limnoperna fortunei*. **Molluscan Research**, v. 30, n. 2, p. 57, 2010.

NIXON, Gillian M. et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **The Journal of pediatrics**, v. 138, n. 5, p. 699-704, 2001.

OLIVEIRA, Marcia D. et al. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In: **Limnoperna fortunei**. Springer, Cham, 2015. p. 333-355.

PARK, Myung Soo et al. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. and *Chryseobacterium taeanense* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 433-438, 2006.

PASCAULT, Noémie et al. A high-throughput sequencing ecotoxicology study of freshwater bacterial communities and their responses to tebuconazole. **FEMS microbiology ecology**, v. 90, n. 3, p. 563-574, 2014.

PETROSINO, Joseph F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PIERCE, Melissa L. et al. The influence of site and season on the gut and pallial fluid

microbial communities of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae): community-level physiological profiling and genetic structure. **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p. 97-113, 2016.

POSTOLLEC, Florence et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

RAMOS SOLANO, B. et al. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 451-457, 2008.

REDFORD, Amanda J.; FIERER, Noah. Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. **Microbial ecology**, v. 58, n. 1, p. 189-198, 2009.

ROMERO, Jaime et al. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial ecology**, v. 44, n. 4, p. 365-371, 2002.

SHAMSIZADEH, Zahra et al. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. **Environmental health and preventive medicine**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2017.

SHIN, Dong-Sung et al. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 1361-1368, 2007.

SOGIN, Mitchell L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

SOLIERI, Lisa; DAKAL, Tikam Chand; GIUDICI, Paolo. Next-generation sequencing and its potential impact on food microbial genomics. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 21-37, 2013.

SUNAGAWA, Shinichi; WOODLEY, Cheryl M.; MEDINA, Mónica. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9554, 2010.

SYLVESTER, F., BOLTOVSKOY, D. and CATALDO, D., 2006. Tasas de clareado: ritmos e impacto. In DARRIGRAN, G. and DAMBORENEA, C., (Eds.). Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano. La Plata: **Edulp**.

TAN, Kai; XU, Can; LONG, Chengxing. Association of microbiota in the stomach of *Sinanodonta woodiana* and its cultured soil. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 1-9, 2020.

TARAS, David et al. 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. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 2, p. 423-428, 2002.

TEELING, Hanno et al. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton

populations induced by a phytoplankton bloom. **Science**, v. 336, n. 6081, p. 608-611, 2012.

THURBER, Rebecca Vega et al. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 8, p. 2148-2163, 2009.

VADDE, Kiran Kumar et al. Next-generation sequencing reveals fecal contamination and potentially pathogenic bacteria in a major inflow river of Taihu Lake. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 113108, 2019.

VAUGHN, Caryn C. Ecosystem services provided by freshwater mussels. **Hydrobiologia**, v. 810, n. 1, p. 15-27, 2018.

VEZZULLI, Luigi et al. Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 495-504, 2018.

WEINGARTEN, Eric A.; ATKINSON, Carla L.; JACKSON, Colin R. The gut microbiome of freshwater Unionidae mussels is determined by host species and is selectively retained from filtered seston. **PLoS One**, v. 14, n. 11, p. e0224796, 2019.

WHON, Tae Woong et al. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. **Journal of virology**, v. 86, n. 15, p. 8221-8231, 2012.

WINTERS, Andrew D.; MARSH, Terence L.; FAISAL, Mohamed. Bacterial assemblages associated with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations in the Laurentian Great Lakes Basin (USA). **Journal of Shellfish Research**, v. 29, n. 4, p. 985-987, 2010.

XU, Mengzhen. Distribution and spread of *Limnoperna fortunei* in China. In: **Limnoperna fortunei**. Springer, Cham, 2015. p. 313-320.

YOUNG, Chiu-Chung et al. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L.(garden lettuce). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 423-426, 2005.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Identificação dos reservatórios, coordenadas geográficas e pontos de coleta das amostras de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) analisadas nas Usinas Hidrelétricas do Alto Rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil.

Reservatório	Coordenadas Geográficas		Identificação
	Latitude	Longitude	
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W	BG1
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W	BG2
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W	BG3
UHE Campos Novos	27° 36' 19,6" S	51° 13' 16,5" W	CN2
UHE Machadinho	27° 31' 01,3" S	51° 37' 23,6" W	MA1
UHE Machadinho	27° 30' 12" S	51° 40' 37,5" W	MA2
UHE Machadinho	27° 31' 23,1" S	51° 46' 54,9" W	MA3
UHE Itá	27° 18' 48" S	51° 10' 75" W	IT2
UHE Itá	27° 27' 26,1" S	51° 53' 22" W	IT3
UHE Foz do Chapecó	27° 10' 24" S	52° 52' 24" W	FC2
UHE Foz do Chapecó	27° 08' 50" S	53° 02' 22,1" W	FC3

Figura suplementar 1. Riqueza e diversidade da comunidade bacteriana presente no trato digestivo do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai. **A)** Quantificação em OTUs. **B)** Número e uniformidade das espécies através do índice de Shannon e a representação da probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente no habitat pertencerem à mesma espécie pelos índices de *Inverse Simpson*, das comunidades microbianas presente na glândula digestiva do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*). CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó.

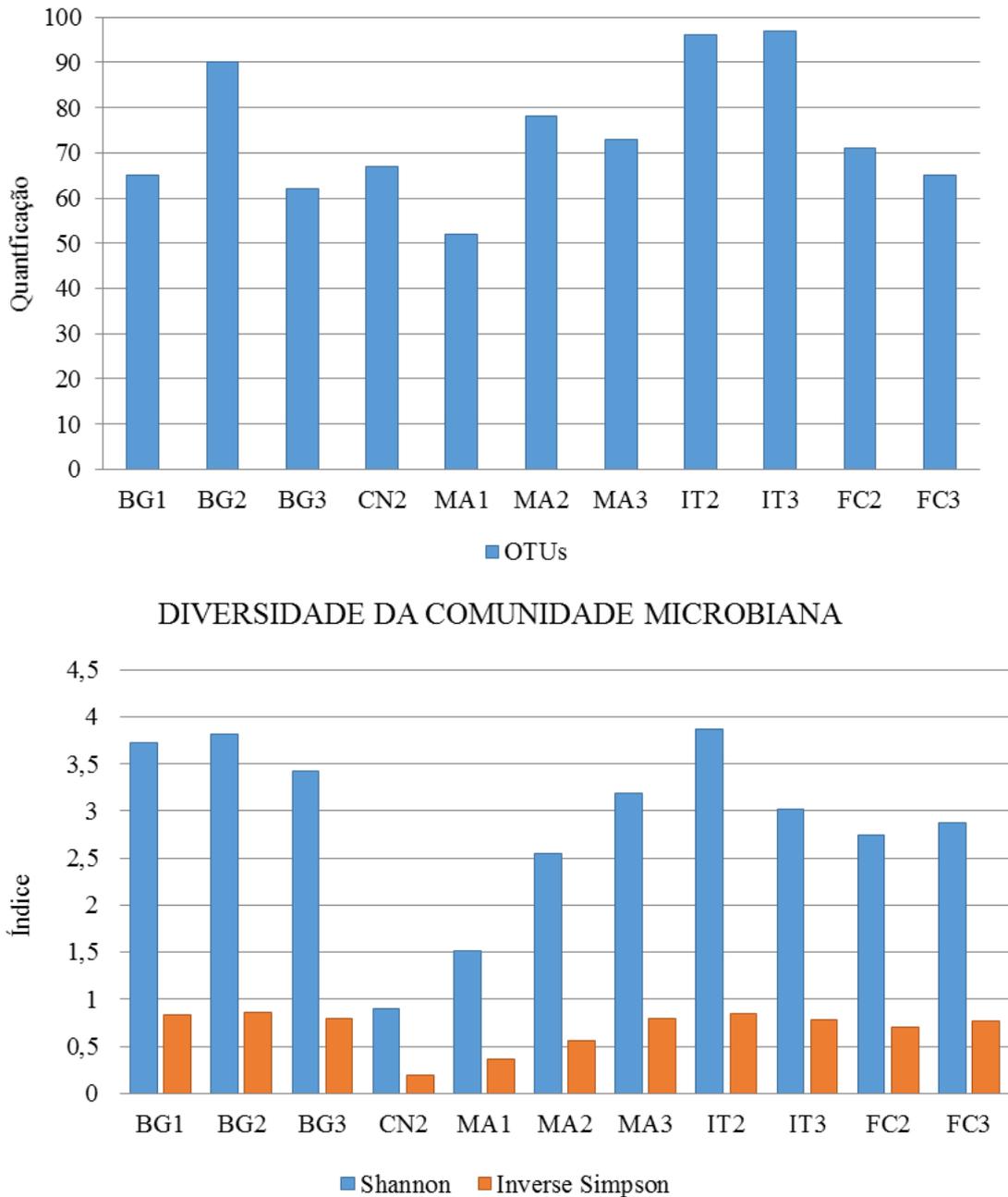


Tabela suplementar 2. Composição da comunidade bacteriana (OTUs), presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) identificada exclusivamente em cada reservatório de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos, BG= Barra Grande, MA= Machadinho, It= Itá, FC= Foz do Chapecó).

UHE Barra Grande		UHE Campos Novos		UHE Machadinho		UHE Itá		UHE Foz de Chapecó	
OTU	Espécie	OTU	Espécie	OTU	Espécie	OTU	Espécie	OTU	Espécie
530	<i>Ligioella gresilensis</i>	281	<i>Orrella dioscoreae</i>	773	<i>Lentimicrobium saccharophilum</i>	390	<i>Lawsonella clevelandensis</i>	259	<i>Dyella flava</i>
296	<i>Streptococcus oralis</i>	134	<i>Aeromonas popoffii</i>	660	<i>Ercella succinigenes</i>	309	<i>Corynebacterium accolens</i>	231	<i>Hermiimonas contaminans</i>
272	<i>Legionella quateirensis</i>	105	<i>Prosthecobacter fusiformis</i>	552	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	222	<i>Veillonella dispar</i>	169	<i>Fluviicola taffensis</i>
215	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	103	<i>Dokdonella kunshanensis</i>	432	<i>Lactobacillus ulunensis</i>	196	<i>Desemzia incerta</i>	154	<i>Geobacter uranireducens</i>
187	<i>Ferribacterium limneticum</i>	44	<i>Gemmata massilitana</i>	355	<i>Petrimonas mucosa</i>	190	<i>Dietzia papillomatosis</i>	138	<i>Acinetobacter hwoffii</i>
180	<i>Leptotrichia wadei</i>	43	<i>Herbaspirillum robiniae</i>	335	<i>Gardnerella vaginalis</i>	187	<i>Clostridium guangxiense</i>	122	<i>Bacillus litoralis</i>
164	<i>Cesiribacter andamanensis</i>	42	<i>Marinobacter halotolerans</i>	289	<i>Aminobacterium colombiense</i>	182	<i>Dietzia maris</i>	105	<i>Ereboglobus luteus</i>
121	<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	39	<i>Irregularibacter muris</i>	268	<i>Lutispora thermophila</i>	172	<i>Croceivirga radialis</i>	66	<i>Geobacter lovleyi</i>
103	<i>Nitrosococcus oceani</i>	30	<i>Aquicella siphonis</i>	253	<i>Erysipelothrix inopinata</i>	169	<i>Luteimonas padinae</i>	63	<i>Neochlamydia hartmannellae</i>
97	<i>Sphingomonas limnosediminicola</i>	28	<i>Thermomarinilinea lacunifontana</i>	161	<i>Xanthomonas nasturtii</i>	164	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	53	<i>Methyloparacoccus murrellii</i>
78	<i>Bauldia consociata</i>	27	<i>Massilia aurea</i>	143	<i>Sedimentibacter salensis</i>	162	<i>Acetivibrio ethanologignans</i>	52	<i>Paludibaculum fermentans</i>

Cont.

73	<i>Conexibacter stalactiti</i>	22	<i>Methylocystis rosea</i>	138	<i>Chryseobacterium taklimakanense</i>	159	<i>Corynebacterium</i>	48	<i>Bacillus cucumis</i>
73	<i>Azorhizobium oxalatiphilum</i>	13	<i>Comamonas testosteroni</i>	121	<i>Luteolibacter gellanilyticus</i>	152	<i>Limisphaera ngatamarikie</i>	48	<i>Roseomonas aquatica</i>
67	<i>Clostridium aciditolerans</i>	10	<i>Methylobacterium populi</i>	117	<i>Caloranaerobacter ferrireducens</i>	140	<i>Verrucomicrobium</i>	36	<i>Orientia chuto</i>
56	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	10	<i>Helicobacter pullorum</i>	114	<i>Aminomonas paucivorans</i>	123	<i>Peptoniphilus lacydonensis</i>	34	<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i>
56	<i>Mesorhizobium thioangeticum</i>	9	<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i>	112	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	117	<i>Streptomyces scabrissporus</i>	34	<i>Luteolibacter pohnpetensis</i>
49	<i>Phaselicystis flava</i>	7	<i>Cystobacter velatus</i>	96	<i>Dorea longicatena</i>	114	<i>Paraburkholderia hospita</i>	29	<i>Pseudoxanthomonas koreensis</i>
42	<i>Planctopirus hydrillae</i>	5	<i>Massilia umbonata</i>	93	<i>Phreatobacter stygus</i>	108	<i>Parachlamydia</i>	27	<i>Marinobacter zhanjiangensis</i>
39	<i>Bacillus aryabhatai</i>	4	<i>Novosphingobium ginsenosidimutans</i>	85	<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	99	<i>Conexibacter woesei</i>	26	<i>Nitrospira multififormis</i>
34	<i>Clostridium swellfuntianum</i>	4	<i>Massilia varians</i>	85	<i>Lysobacter bruneseens</i>	98	<i>Bacteroides barnesiae</i>	18	<i>Rhizobium zeae</i>
32	<i>Methyloporosula polaris</i>	3	<i>Singulisphaera rosea</i>	82	<i>Granulicella acidiphila</i>	93	<i>Vampirovibrio</i>	12	<i>Georgfuchsia toluolica</i>
27	<i>Brevundimonas stalevi</i>	3	<i>Massilia lutea</i>	79	<i>Intestinimonas butyrificiproducens</i>	74	<i>Clostridium kogasensis</i>	11	<i>Permianibacter aggregans</i>
25	<i>Sediminibacter furfurosus</i>			63	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	73	<i>Sphingomonas oryzae</i>	9	<i>Nocardioidea islandensis</i>
24	<i>Gaiella occulta</i>			58	<i>Hellea balneolensis</i>	67	<i>Garicola koreensis</i>	6	<i>Sphingomonas aerophila</i>
23	<i>Legionella hackeliae</i>			56	<i>Chelativorans multitrophicus</i>	51	<i>Paracoccus hibiscisoli</i>		

Cont.

18	<i>Azospira oryzae</i>	52	<i>Rhodopirellula baltica</i>	49	<i>Methylothera versatilis</i>
16	<i>Polymorphobacter fuscus</i>	51	<i>Holophaga foetida</i>	47	<i>Desulfatirhabdium butyrativorans</i>
16	<i>Legionella shakespearei</i>	42	<i>Marricaulis salignorans</i>	45	<i>Methylomagnum ishizawai</i>
10	<i>Tatlockia micdadei</i>	40	<i>Coxiella burnetii</i>	40	<i>Geobacter pelophilus</i>
6	<i>Fimbrimonas ginsengisoli</i>	36	<i>Gemella taiwanensis</i>	36	<i>Clostridium rantiibutyricum</i>
6	<i>Parasediminibacterium paludis</i>	21	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	35	<i>Actinomyces tolaasii</i>
6	<i>Oligoflexus tunisiensis</i>	15	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	32	<i>Gracilibacter ermotolerans</i>
5	<i>Solirubrobacter ginsenosidimuta</i>	13	<i>Dongia mobilis</i>	32	<i>Pseudorhodoplanes sinuspersici</i>
3	<i>Kofteria flava</i>	9	<i>Mycolicibacterium tusciae</i>	31	<i>Methylobacterium tarhaniae</i>
3	<i>Haliea atlantica</i>	6	<i>Lactobacillus iners</i>	31	<i>Caballeronia arvi</i>
		3	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	30	<i>Sporomusa silvacetica</i>
		3	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i>	22	<i>Rivicola pingtungensis</i>
				17	<i>Blastopirellula cremea</i>
				11	<i>Nocardioidees daphniae</i>
				11	<i>Flavobacterium cauense</i>

Cont.

10	<i>Ilumatobacter fluminis</i>
9	<i>Geobacter bremensis</i>
9	<i>Legionella dresdenensis</i>
9	<i>Luteolibacter algae</i>
7	<i>Litorilinea aerophila</i>
4	<i>Methyloversatilis discipulorum</i>
4	<i>Luteolibacter flavescens</i>
3	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i>
3	<i>Dongia soli</i>
3	<i>Ramlibacter ginsenosidimitans</i>
3	<i>Steroidobacter agariperforans</i>

Tabela suplementar 4. Abundância relativa do sequenciamento de OTUs (do total de OTUs) da comunidade bacteriana com potencial patogênicidade para homens e peixes, presente no trato digestivo de mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) amostrados nos diferentes pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai (CN= Campos Novos. BG= Barra Grande. MA= Machadoinho. It= Itá. FC= Foz do Chapecó).

Gênero	BG1	BG2	BG3	CN2	MA1	MA2	MA3	IT2	IT3	FC2	FC3
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0,16	0,1	0	0	0,42	0	0	0,1	0,5	0
<i>Streptococcus</i>	0,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dorea</i>	0	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i>	0	0	0	0,19	0	0	0	0	0	0	0
<i>Elizabethkingia</i>	0	1,36	1,73	0	0	1,61	1,73	1,8	3,7	0	9,5
<i>Pseudomonas</i>	0,29	0	0	0,07	0	0	11,9	0	0	0,1	0,6
<i>Mycoplasma</i>	0	0	0,38	0,05	0,78	0	0,36	0,3	3,5	0	0

2.2 ARTIGO 2

Caracterização do microbioma digestivo do *Limnoperna fortunei* coletados em diferentes estações do ano no alto Rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil

Tamiris Henrique Ferreira¹, Lúvia Souza Sá¹, Paula Brando de Medeiros¹, Domickson Silva Costa¹, Bruno da Silva Pierri¹, Jacó Joaquim Mattos², Alex Pires de Oliveira Nuner³, Grasiela Fagundes Minatto Cardoso⁴, Maurício Laterça Martins¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹

¹ AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

² LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³ LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Rodovia Francisco Thomaz dos Santos, 3532, CEP 88066-260, Florianópolis, SC, Brasil

⁴ Engie Brasil Energia S/A, Rua Paschoal Apóstolo Pítsica, 5064, 88025-255, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi identificar a microbiota digestiva deste invasor e caracterizar a sua estrutura em diferentes estações do ano. As amostragens de *L. fortunei* foram realizadas no inverno (setembro/2019) e verão (março de 2020), nos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil. Em cada um dos reservatórios foram amostrados três pontos, para cada ponto ($n=15$) mexilhões foram submetidos a biometria e armazenados em caixas térmicas refrigerada (4,0 °C). Posteriormente, cada mexilhão foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada do divertículo digestivo e de porções do intestino, identificado e armazenado individualmente em microtubos livres de RNase e DNase e preservados a -20 °C. Após a extração DNA das bactérias presentes no material coleado, as amostras foram submetidas ao SAR. Foi possível concluir que o *L. fortunei* que ocorre na região do alto Rio Uruguai, possuem uma microbiota que se diferencia entre as estações do ano inverno e verão. As comunidades microbianas presente no trato digestivo do *L. fortunei*, apresentaram maior riqueza e diversidade bacteriana em amostras do verão. Apesar disto, os filos dominantes foram Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria, independentemente da estação do ano. Além de identificar 142 OTUs compartilhadas entre as amostras digestivas do inverno e verão que não sofreram influência do período coletado, indicaram a formação de uma *core microbiota*.

Highlights

- Primeiro relato da caracterização da microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* em diferentes estações do ano.
- Caracterização da microbiota do trato digestivo do mexilhão-dourado em diferentes estações do ano.
- Core microbiota de *Limnoperna fortunei*

2.2.1 Introdução

Os moluscos bivalves são organismos que filtram grandes quantidades de água para necessidades nutricionais e respiratórias. Eles estão localizados nos primeiros níveis de muitas teias alimentares aquáticas e desempenham um importante papel ecológico, regulando a turbidez da coluna d'água, reciclando nutrientes e matéria orgânica e controlando a biomassa fitoplanctônica (BINELLI; PROVINI, 2003).

O *Limnoperna fortunei*, popularmente conhecido como mexilhão-dourado, é um molusco bivalve de água doce originário de rios e córregos da China e Sudeste Asiático (Darrigran e Ezcurra, 2000). Esta espécie tem um alto potencial reprodutivo e adaptativo, e não possui patógenos naturais nos sistemas aquáticos invadidos (DARRIGRAN; DAMBORENEA, 2006, DARRIGRAN; EZCURRA, 2000). Além disso, o mexilhão-dourado tem a capacidade de colonizar habitats amplos com temperaturas da água variando de 0 a 35 °C, velocidades de fluxo de 0,1 a 2 m s⁻¹, profundidades de água entre 0,1 e 40 m, oxigênio dissolvido de 0,2 a 11,33 mg l⁻¹ e níveis de pH de 6,0 –7,8 (DARRIGRAN et al., 2011).

Esse molusco é considerado uma espécie engenheira, devido às alterações estruturais potenciais que pode causar, em função de sua capacidade de filtração, entre as mais altas registradas para bivalves, e de macroaglomeração (SYLVESTER et al., 2006; DARRIGRAN; DAMBORENEA, 2011).

Dentre as particularidades que torna essas espécies invasoras tão fortes é sua resistência a condições ambientais adversas e a diferentes tipos de poluentes químicos (MORTON, 1982; CLAUDI; MACKIE, 1994; COSTA et al., 2011; GOMES et al., 2014). Devido aos seus hábitos alimentares, sedentarismo, abundância, ampla distribuição em diferentes corpos d'água, tolerância a uma ampla gama de condições ambientais e tendência a

acumular contaminantes em seus tecidos, bem como as bactérias presentes na água. No entanto, existem lacunas na literatura sobre a ecologia microbiana de mexilhões, que é complexa e influenciada pelo ambiente (BELAICH et al., 2006; SUI et al., 2017).

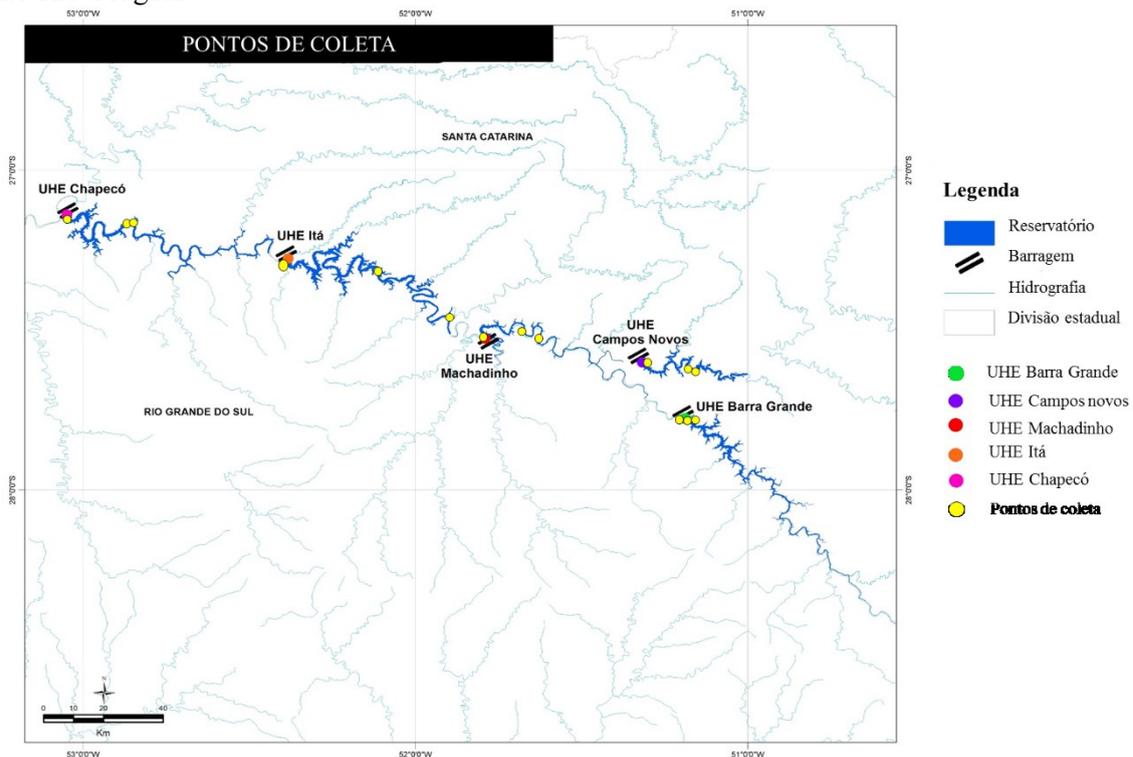
Portanto, a fim de se ampliar o conhecimento da comunidade bacterina presente em *L. fortunei* que ocorre na região do alto Rio Uruguai, o objetivo do presente estudo foi identificar a microbiota digestiva em diferentes estações do ano.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Local de coleta

As amostragens de *L. fortunei* foram realizadas em duas estações do ano, inverno (setembro/2019) e verão (março de 2020), onde foram coletadas amostras do trato digestivo que compreendiam os divertículos digestivos e porções do intestino do mexilhão-dourado presente em cinco reservatórios de usinas hidrelétricas (UHE): UHE Campos Novos, UHE Barra Grande, UHE Machadinho, UHE Itá e UHE Foz de Chapecó, localizadas na região do alto Rio Uruguai, Santa Catarina, Brasil. Em cada um dos reservatórios foram amostrados três pontos. (Figura 1 e Tabela suplementar 1).

Figura 1 - Localização das barragens e pontos de coleta dos reservatórios de usinas hidrelétricas do alto Rio Uruguai.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.2.2.2 Armazenamento e preparo das amostras

Foram coletados 15 mexilhões adultos, com comprimento médio ($2,92 \pm 0,21$ no inverno e $2,99 \pm 0,35$ no verão), de cada ponto amostral, em profundidades de até 1,0 m, de superfícies duras, incluindo pedras, rochas e aglomerados de mexilhões. Os mesmos foram armazenados em caixas térmicas refrigerada ($4,0 \text{ }^\circ\text{C}$) até o momento da dissecação. Cada animal foi aberto assepticamente com auxílio de um bisturi esterilizado para retirada dos divertículos digestivos e porções do intestino. Esse material foi identificado e armazenado individualmente em microtubos livres de ácidos ribonucleicos (RNAse) e ácidos desoxirribonucleicos (DNAse), preservados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e transportados para o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Durante as coletas foram aferidos os parâmetros de qualidade de água, incluindo temperatura, pH e a concentração de oxigênio dissolvido em cada ponto de coleta.

2.2.2.3 Extração de DNA

Para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das bactérias presentes no material coletado, foram utilizadas 200 mg da porção que compreendia os divertículos digestivos e o intestino dos mexilhões para cada um dos 15 pontos de coleta (três *pools* de cinco mexilhões), utilizando o kit QIAamp® *Fast DNA Stool Mini* (QIAGEN, Hilden, Alemanha, DE), seguindo-se as especificações do fornecedor. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop*™ 1000 (*Thermo Scientific* DE, US) e mantidas em concentração acima de $100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

2.2.2.4 Amplificação da PCR

Após a extração do DNA, as amostras foram enviadas à empresa MacroGen® para a análise de metagenômica. A amplificação do gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA), foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), tendo-se como alvo a sequência entre as regiões preservadas V3 e V4.

2.2.2.5 Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR)

No sequenciamento dos dados utilizou-se a tecnologia *Illumina* SBS, que marca os nucleotídeos por fluorescência quando estes se ligam a fita complementar em cada ciclo. As sequências com ruído foram removidas e as leituras representativas restantes dos *clusters* foram agrupadas usando o algoritmo complexo em *Operational Taxonomy Units* (OTUs), através do

ajuste rápido de comprimento de leituras curtas (FLASH). As leituras foram agrupadas com 100% de identidade (ID) usando *CD-HIT-DUP* em um único arquivo. As OTUs foram coletadas usando um filtro de qualidade para garantir 97% de ID no nível da espécie. Para o sequenciamento, foi utilizado o alinhamento mínimo de 300 pb e com 100 k de leituras por amostra.

2.2.2.6 Análises estatísticas

Foi realizada de acordo com a metodologia de Caporaso et al. 2010, através do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) onde as UTOs criadas foram relacionadas aos seus táxons correspondentes através da ferramenta “*assign_taxonomy.py*” comparadas com o banco de dados *Greengenes* (<http://qiime.org>). Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana nos períodos amostrados, foi feita uma análise de rarefação α , os índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, através da ferramenta “*alpha_diversity.py*”, onde foram calculados o índice Cobertura de Sequenciamento, como $C = 1 - (S / n)$, onde S é o número de OTUs exclusivos e n é o número de indivíduos na amostra, que expressa o quanto a amostra representa o ambiente, em medida relativa. O índice de diversidade de Shannon, que leva em consideração o número e a uniformidade da distribuição das espécies, o índice de riqueza Chao1, que direciona a estimativa de riqueza Chao1 para uma definição de OTU e o índice *Inverse Simpson* ($H = - \sum_{i=1}^s (pi \log_2 pi)$), onde s é o número de OTUs e pi é a proporção da comunidade representada pela OTU i , seguidos pelo teste t de student. O diagrama de Venn foi projetado para determinar as OTUs bacterianas únicas e aquelas compartilhadas entre diferentes as estações do ano, através do programa *InteractiVenn* (www.interactivenn.net, Heberle et al., 2015).

2.2.3 Resultados

Nossos estudos revelaram que os dados de sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA, para as amostradas da microbiota digestiva do mexilhão-dourado, resultaram em um total de 1.106.053 *reads* nas amostras de inverno e 1.545.115 *reads* nas amostras de verão, que após limpeza e filtragem foram qualificadas como de alta qualidade.

A cobertura de sequenciamento, considerando-se todas as amostras, foi superior a 99%, indicando que o sequenciamento do gene 16S rRNA forneceu uma base sólida para o alinhamento dos *reads*, de modo a permitir a identificação da maioria das bactérias presentes nas amostras. As curvas de rarefação (Figura 2) atingiram seu patamar de saturação, indicando que foi possível determinar a riqueza bacteriana das amostras, bem como que a maior parte da

diversidade microbiana nela presentes foi obtida. Com altos índices α identificados, especialmente nas amostras do verão, após teste de Tukey, foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os índices. Consideramos, então, que as amostras do verão apresentaram maior riqueza e diversidade do que as do inverno (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise dos dados obtidos a partir do sequenciamento de alto rendimento (SAR) em amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai.

	Inverno	Verão
<i>Cont reads</i>	573.111 ^b	623.402 ^a
OTUs	280 ^b	960 ^a
Filo	16 ^b	20 ^a
Classe	39 ^b	55 ^a
Gênero	218 ^b	572 ^a
Índices		
Chao1	74 ^b	267 ^a
Shannon	2,87 ^b	6,35 ^a
Inverse Simpson	0,68 ^b	0,95 ^a
Cobertura	99,99%	99,99%

Fonte: Elaborado pelo autor

OTUs: *Operational Taxonomic Units*. Diferentes letras em cada linha indicam diferenças significativas (ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$)

Nos parâmetros de qualidade de água observamos diferença significativa na temperatura ($p < 0,05$) e oxigênio dissolvido ($p < 0,05$) para as amostras do verão (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de qualidade de água, temperatura (°C), pH e concentração de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), amostrados nos diferentes pontos de coleta do alto Rio Uruguai.

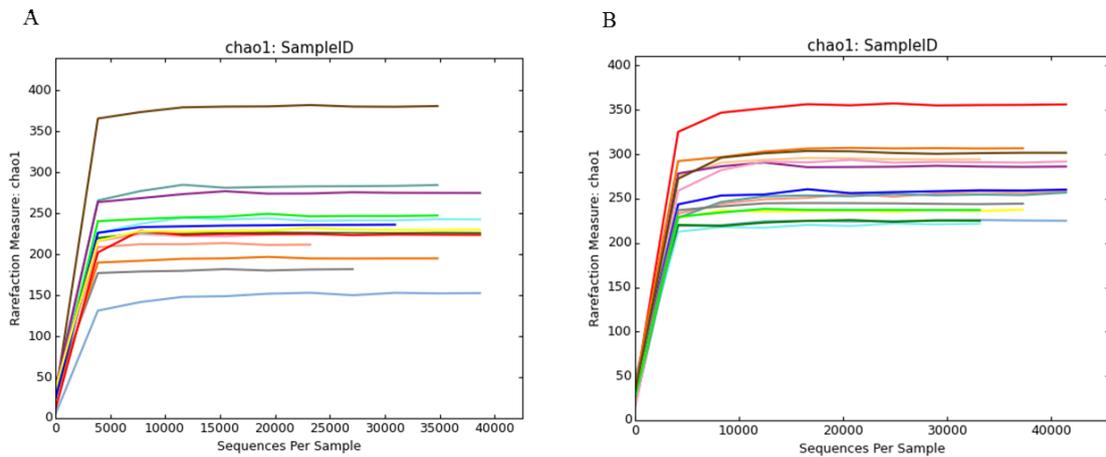
Período de coleta	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})
Inverno	19,30 \pm 1,58 ^b	6,79 \pm 0,19	8,75 \pm 0,50 ^b
Verão	26,15 \pm 1,37 ^a	6,61 \pm 0,28	7,20 \pm 0,34 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor

* $n=15$ (média \pm desvio padrão)

Diferentes letras em cada coluna indicam diferenças significativas
Dados com diferença significativa ($p < 0,05$)

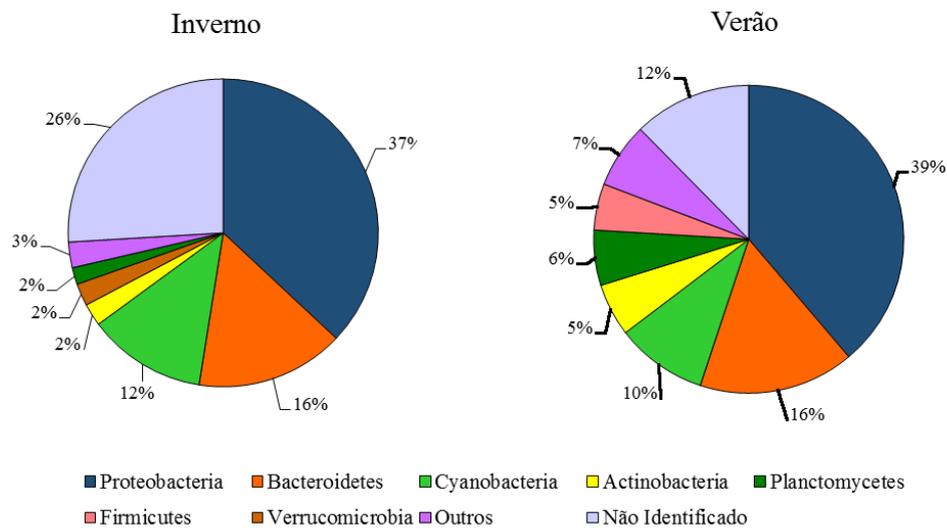
Figura 2 - Curvas de rarefação para as bibliotecas 16S rRNA bacterianas. Curvas do índice Chao1 onde: A) Curvas que indicam riqueza de espécies no inverno. B) Curvas que indicam riqueza de espécies no verão.



Fonte: Elaborado pelo autor

A composição bacteriana presente no trato digestivo do mexilhão-dourado, foi representada através da abundância relativa no inverno e no verão. Com um total de 16 táxons de Filos encontrados no inverno, a análise apresentou os seis principais, onde o Proteobacteria, foi representado como o mais abundante, com 37% dos microrganismos, seguido pelos Filos Bacteroidetes (16%), Cyanobacteria (12%), Actinobacteria (2%), Verrucomicrobia (2%) e Planctomycetes (2%). Já no verão o número de táxons foi superior, apresentando um total de 20 OTUs, das quais as mais abundantes apresentaram a seguinte composição: Proteobacteria (39%), Bacteroidetes (17%), Cyanobacteria (10%), Planctomycetes (6%), Actinobacteria (5%) e Firmicutes (5%) (Figura 3). Além disso, foram classificados em Outro os organismos que não atingiram abundância relativa maior que 0,8% nas diferentes estações do ano analisadas. Assim, constatamos que a abundância relativa variou nas diferentes estações do ano, apresentando maior abundância relativa nas amostras do verão como apresentado na Tabela 1 e Figura 3.

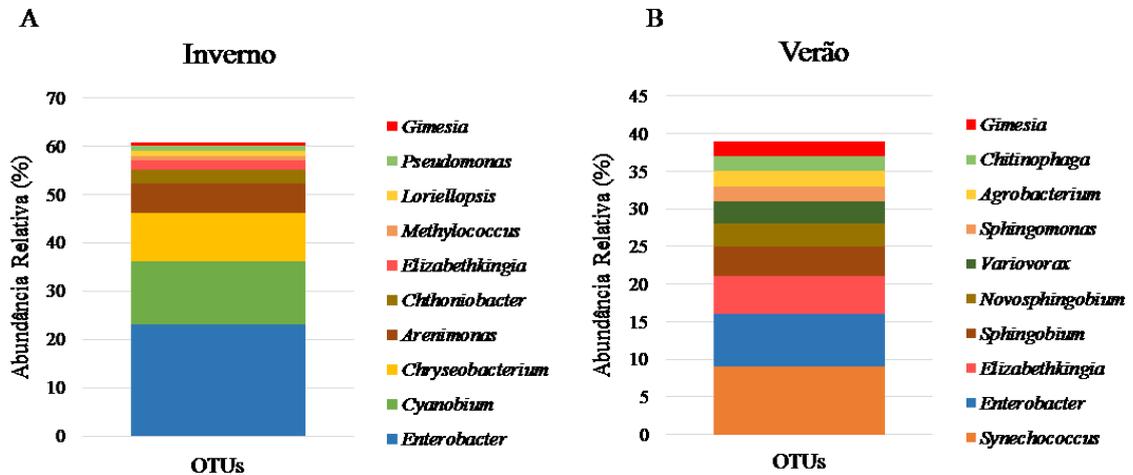
Figura 3 - Abundância relativa da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Filo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Com base nos dados do SAR, foi possível identificar os dez Gêneros mais abundantes de microrganismos presentes nas amostras do trato digestivo do mexilhão-dourado. Três Gêneros foram comuns: *Enterobacter*, *Elizabethkingia* e *Gimesia*, independentemente da estação do ano. Entretanto, o Gênero *Enterobacter* (23%) prevaleceu sobre todos os outros nas amostras do inverno, seguido pelo *Cyanobium* (13%) e *Chyseobacterium* (10%) (Figura 4). Por outro lado, nas amostras do verão, o Gênero *Synechococcus* (9%) apresentou a maior abundância relativa, em segundo e terceiro o *Enterobacter* (7%) e *Elizabethkingia* (5%), respectivamente (Figura 4).

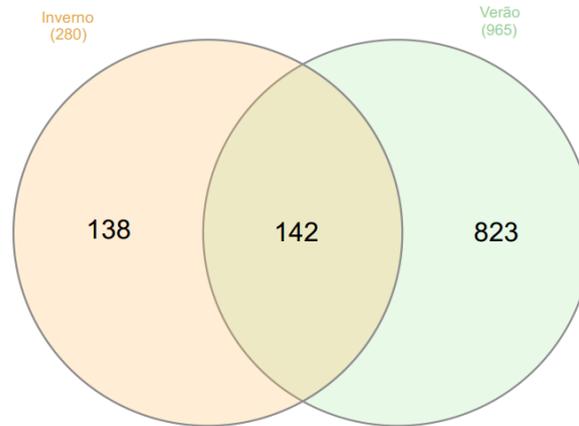
Figura 4 - Abundância relativa da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Gênero. A) Gêneros dominantes em amostras do inverno. B) Gêneros dominantes em amostras do verão.



Fonte: Elaborado pelo autor

No que diz respeito a microbiota elementar, para a procura de OTUs únicas ou compartilhadas em nível de espécie, em termos quantitativos, construímos o diagrama de *Venn* (Figura 5). O mesmo apresentou que 142 OTUs foram compartilhadas entre as amostras digestivas do inverno e verão, ou seja, 13% das OTUs não foram influenciadas pelo período coletado. Quando falamos sobre as estações isoladas 138 OTUs (12% do total de OTUs) foram observadas apenas no inverno, enquanto 823 OTUs (75% do total de OTUs) eram únicas do verão. Dentre as espécies comuns as duas estações do ano a *Chryseobacterium vietnamense* (17%) teve a maior abundância relativa seguida pela *Cyanobium gracile* (15%), *Synechococcus rubescens* (13%), *Arenimonas maotaiensis* (9%) e *Chthoniobacter flavus* (4%), totalizando 59% do total de OTUs compartilhadas entre os conjuntos.

Figura 5 - Diagrama de Venn indicando OTUs (*Operational Taxonomic Units*) singulares e compartilhadas, em nível de espécie, da composição da microbiota digestiva do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. Cada elipse representa um conjunto. A intersecção das duas elipses denota o número de OTUs compartilhadas entre conjuntos. Números fora da área de intersecção correspondem ao número de OTUs exclusivos de determinado conjunto.



Fonte: Elaborado pelo autor

Ademais, a análise e a caracterização do perfil da microbiota em estudo mostraram, ainda, a presença de cinco espécies de bactérias, mais abundantes relativamente para cada período amostrado. No inverno a *Enterobacter tabaci* (23%), pertencente ao filo Proteobactéria teve maior abundância relativa entre todas as espécies identificadas, seguida pela *Cyanobium gracile* (13%), *Chryseobacterium vietnamense* (10%), *Arenimonas maotaiensis* (6%) e a *Chthoniobacter flavus* (3%), que representaram 55% do total OTUs. Por outro lado, as amostras do verão o microrganismo com maior abundância relativa foi a *Synechococcus rubescens* (9%) pertencente ao filo Cyanobacteria, seguido pela *Enterobacter mori* (7%), *Elizabethkingia anophelis* (4%), *Sphingobium czechense* (4%) e a *Variovorax boronicumulans* (2%) representados no Cladograma da Figura 6.

2.2.4 Discussão

A caracterização da microbiota digestiva e a sua estrutura em diferentes estações do ano, foram detectadas pela primeira vez em *Limnoperna fortunei* presente no alto Rio Uruguai. A comunidade microbiana de um animal disposto em ambiente natural pode refletir as condições impostas pelo ambiente externo, bem como o ambiente que o cerca. Os resultados do atual estudo indicam que as diferentes estações do ano, influenciadas pela variação de fatores abióticos como a temperatura, induziram uma mudança na microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* presente no Alto rio Uruguai.

Os animais aquáticos estão em um meio que favorece a exposição a micróbios porque a dieta, a água e os sedimentos abrigam altos níveis de microrganismos que podem colonizar as suas superfícies corporais externas e internas. A microbiota intestinal de moluscos é proposta como dependente do conteúdo microbiano da água devido ao grande volume que flui através deste tecido (GATESOUBE, 1999). Embora os mecanismos exatos da interação hospedeiro-bactéria sejam elusivos, as mudanças nas comunidades bacterianas no intestino podem estar intimamente relacionadas à fisiologia do hospedeiro (CHEN et al., 2018). Além disso, temperaturas elevadas podem levar à heterogeneidade da composição da comunidade bacteriana (ERWIN et al., 2012), conforme apresentada em estudos realizados com mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*, onde houve aumento significativo da diversidade microbiana na microbiota intestinal (LI et al, 2019) e *Dreissena polymorpha* onde a maior influência na estrutura da comunidade microbiana presente no molusco foi ocasionada pela temperatura da água onde foram coletados (MATHAI et al. 2020). Estudos realizados com o *L. fortunei* na América do Sul demonstraram que o aumento da temperatura influenciou em diversos fatores ocasionados por mudanças térmicas, incluindo taxa de filtração, atividade reprodutiva, mortalidade e distribuição (BOLTOVSKOY, 2015). Nossas análises, realizadas através do sequenciamento de alto rendimento, demonstraram que as comunidades microbianas presente no trato digestivo do *L. fortunei*, apresentaram maior riqueza e diversidade bacteriana em amostras do verão, onde a temperatura estava significativamente mais elevada do que no inverno, apresentando em média $26,15 \pm 1,37$ °C. Resta saber se a mudança na comunidade bacteriana foi devido a uma mudança na fisiologia do mexilhão causada pelo aumento da temperatura da água ou uma resposta direta das bactérias à temperatura.

O presente estudo revelou que o intestino do mexilhão-dourado era dominado por três Filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. Apesar das amostras do verão apresentarem uma abundância relativa mais elevada significativamente do que a do inverno, os

filos mais abundantes nas duas estações permaneceram os mesmos. A presença do Proteobacteria em reservatórios de água doce é uma característica comum e este filo tem sido caracterizado por participar ativamente de processos biogeoquímicos de ecossistemas lacustres (ZHANG et al., 2015), este táxon também foi edificado em emassado visceral total de *D. polymorpha* coletados em ambientes lacustres (MATHAI et al., 2020). Os microrganismos pertencentes ao filo Bacteroidetes foram abundantemente encontrados em intestinos de pequenos abalones *Haliotis diversicolor* (ZHAO et al., 2018), caranguejo *Callinectes sapidus* (GIVENS et al., 2013) e ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (HAKIM et al., 2015).

Microrganismos transitórios adquiridos do meio ambiente podem ser abundantes em grupos microbianos intestinais dos animais (KING et al., 2012; PIERCE et al., 2016). O terceiro táxon mais abundante em nosso conjunto de dados foi o pertencente ao filo Cyanobacteria que são absorvidas como alimento por bivalves (AVILA-POVEDA et al., 2014), indicando que a abundância deste filo no trato digestivo do *L. fortunei* pode estar relacionado passagem temporária no processo digestivo do mesmo.

Além disso, a classificação taxonômica da microbiota, baseada no gene 16S rRNA, revelou que a microbiota do *L. fortunei* detinha entre as OTUs membros do gênero *Enterobacter*, *Elizabethkingia*, *Gimesia* e *Chryseobacterium*. Alguns desses gêneros bacterianos foram detectados em mexilhões marinhos, como *Mytilus* sp. (LI et al., 2018; SCHIL et al., 2017; UTERMANN et al., 2018; VEZZULLI et al., 2018) e *Brachidontes* sp. (CLEARY et al., 2015; CLEARY; POLÓNIA, 2018). No mais a análise e a caracterização do perfil da microbiota em estudo mostraram as espécies de bactérias, mais abundantes relativamente para cada período amostrado. No inverno a *Enterobacter tabaci* (23%), teve maior abundância relativa entre todas as espécies identificadas e as amostras do verão o microrganismo com maior abundância relativa foi a *Synechococcus rubescens* (9%). A quantidade elevada desses táxons presente no trato digestivo do *L. fortunei* sugere uma associação funcional com o hospedeiro, como o envolvimento microbiano no metabolismo de nutrientes e fonte de nutrição do mesmo.

No que diz respeito a microbiota elementar, o diagrama de *Venn* revelou OTUs compartilhadas em nível de Espécie, em termos quantitativos. O mesmo apresentou que 142 OTUs foram compartilhadas entre as amostras digestivas do inverno e verão, ou seja, 13% das OTUs não foram influenciadas pelo período coletado, indicando uma *core microbiota*, que é definida como o grupo de microrganismos comumente encontrados dentro do microbioma de um hospedeiro, através das fronteiras de espaço e tempo, com base na sua persistência (HERNANDEZ-AGREDA, 2017). Dentre as espécies comuns as duas estações do ano, a *Chryseobacterium vietnamense*, *Cyanobium gracile*, *Synechococcus rubescens*, *Arenimonas*

maotaiensis e *Chthoniobacter flavus*, totalizando 59% do total de OTUs compartilhadas entre os conjuntos. Essas estão presente em ambientes naturais, como a *C. vietnamense* isolada do solo florestal no Vietnã (LI; ZHU, 2011), *C. gracile* água doce da lagoa Adongji, Korea (KWON et al., 2021), *S. rubescens* isolada de solo na Holanda (REIMER et al., 2022), *A. maotaiensis* isolada da água doce Rio Chishui, China (YUAN et al., 2014), e *C. flavus* isolada de solo de pastagem na Austrália (SANGWAN et al., 2004). Os relatos sobre a presença desses microrganismos são escassos, mas como são isoladas principalmente de solo e água, indicam que a sua abundância relativa alta no trato digestivo do *L. fortunei* coletado em diferentes estações do ano, tenha relação com a nutrição do molusco.

2.2.5 Conclusões

De acordo com as nossas conclusões, o *L. fortunei* que ocorre na região do alto Rio Uruguai, possuem uma microbiota que se diferencia entre as estações do ano inverno e verão. Onde as comunidades microbianas presente no trato digestivo do *L. fortunei*, apresentaram maior riqueza e diversidade bacteriana em amostras do verão, que possuía a temperatura significativamente mais elevada do que no inverno. Apesar disto, os filos dominantes no trato digestivo do mexilhão-dourado eram dominados por Proteobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria, independentemente da estação do ano. Além de identificar 142 OTUs compartilhadas entre as amostras digestivas do inverno e verão que não sofreram influência do período coletado, indicaram a formação de uma *core microbiota*.

2.2.6 Agradecimentos

À Engie Brasil Energia, Itá Energética, Energética Barra Grande, Campos Novos Energia, Foz do Chapecó Energia, financiadores desta pesquisa desenvolvida no âmbito do Programa de P&D regulado pela ANEEL (PD-00403-0043/2017); à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela Bolsa de Doutorado para T.H. Ferreira; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 306635/2018-6) e J.L.P. Mouriño (CNPq 301524/2017-3); a PhD J. Ribolli pela revisão do manuscrito e ao PhD. V. A. Pontinha (*in memoriam*) pela contribuição intelectual e auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa. Nenhum cientista faz ciência sozinho.

Colaboração dos autores

Tamiris Henrique Ferreira: Execução do experimento e análises, revisão bibliográfica e escrita.

Lúvia Souza Sá: Investigação e colaboração na análise de extração de DNA.

Paula Brando de Medeiros: Investigação e coleta de material biológico para análises.

Domickson Silva Costa: Investigação e Análises estatísticas.

Bruno da Silva Pierri: Auxílio nas análises de Bioinformática.

Jacó Joaquim Mattos: Investigação e juste metodológico para extração de DNA das amostras.

Alex Pires de Oliveira Nuner: Investigação.

Grasiela Fagundes Minatto Cardoso: Investigação.

Maurício Laterça Martins: Investigação.

José Luiz Pedreira Mouriño: Investigação e revisão da escrita.

REFERÊNCIAS

MORTON, BRIAN. Some aspects of the population structure and sexual strategy of *Corbicula cf. fluminalis* (Bivalvia: Corbiculacea) from the Pearl River, People's Republic of China. **Journal of Molluscan Studies**, v. 48, n. 1, p. 1-23, 1982.

BINELLI, A.; PROVINI, A. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. **Chemosphere**, v. 53, n. 2, p. 143-151, 2003.

BOLTOVSKOY, Demetrio. Distribution and colonization of *Limnoperna fortunei*: special traits of an odd mussel. In: *Limnoperna fortunei*. **Springer, Cham**, 2015. p. 301-311.

CLEARY, D. F. R.; POLÓNIA, A. R. M. Bacterial and archaeal communities inhabiting mussels, sediment and water in Indonesian anchialine lakes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 2, p. 237-257, 2018.

CLEARY, Daniel FR et al. Composition and predicted functional ecology of mussel-associated bacteria in Indonesian marine lakes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 3, p. 821-834, 2015.

ERWIN, Patrick M. et al. Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7358-7368, 2012.

DARRIGRAN, Gustavo; DAMBORENEA, Cristina. Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano. **Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)**, 2006.

DARRIGRAN, Gustavo et al. Environmental factors restrict the invasion process of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in the Neotropical Region: a case study from the Andean tributaries. In: **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**. EDP Sciences, 2011. p. 221-229.

DARRIGRAN, G.; EZCURRA DE DRAGO, I. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnopema fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia: Mytilidae) in South America. **The Nautilus**, v.

114, n. 2, p. 69-73, 2000.

MACKIE, Gerald L.; CLAUDI, Renata. **Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems**. CRC Press, 2009.

GATESOUBE, Francois Joel. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GIVENS, Carrie E. et al. Microbial communities of the carapace, gut, and hemolymph of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. **Marine biology**, v. 160, n. 11, p. 2841-2851, 2013.

HAKIM, Joseph A. et al. An abundance of Epsilonproteobacteria revealed in the gut microbiome of the laboratory cultured sea urchin, *Lytechinus variegatus*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1047, 2015.

GOMES, João et al. Evaluation of candidate biocides to control the biofouling Asian clam in the drinking water treatment industry: An environmentally friendly approach. **Journal of Great Lakes Research**, v. 40, n. 2, p. 421-428, 2014.

ZHANG, Jingxu et al. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3291-3302, 2015.

KWON, Dae Ryul et al. New records of the genus *Cyanobium* and *Cyanobium gracile* (Synechococcales, Cyanophyceae) in Korean freshwater. **Korean Journal of Environmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 32-38, 2021.

LI, Zhikun; ZHU, Honghui. *Chryseobacterium vietnamense* sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt_4, p. 827-831, 2012.

LI, Yi-Feng et al. Characterization of gut microbiome in the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to thermal stress. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1086, 2019.

LI, Yi-Feng et al. Elevated seawater temperatures decrease microbial diversity in the gut of *Mytilus coruscus*. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 839, 2018.

REIMER, Lorenz Christian et al. Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D741-D746, 2022.

MARIANO, Belaich et al. Evaluation of a biomarker of Cd (II) exposure on *Limnoperna fortunei*. **Environmental pollution**, v. 144, n. 1, p. 280-288, 2006.

MATHAI, Prince P. et al. Water and sediment act as reservoirs for microbial taxa associated with invasive dreissenid mussels. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 134915, 2020.

CLAUDI, Renata; MACKIE, Gerald L. **Practical Manual for the Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Sys**. CRC Press, 1993.

COSTA, Raquel et al. Enhanced mortality of the biofouling zebra mussel, *Dreissena*

polymorpha, through the application of combined control agents. **Journal of Great Lakes Research**, v. 37, n. 2, p. 272-278, 2011.

SANGWAN, Parveen et al. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria classis* nov., of the phylum Verrucomicrobia. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5875-5881, 2004.

SCHILL, William B.; IWANOWICZ, Deborah; ADAMS, Cynthia. *Endozoicomonas dominates* the gill and intestinal content microbiomes of *Mytilus edulis* from Barnegat Bay, New Jersey. **Journal of Shellfish Research**, v. 36, n. 2, p. 391-401, 2017.

SYLVESTER, F., BOLTOVSKOY, D. and CATALDO, D., 2006. Tasas de clareado: ritmos e impacto. In DARRIGRAN, G. and DAMBORENEA, C., (Eds.). Bio-invasion del mejillón dorado en el continente americano. La Plata: Edulp.

SYLVESTER, F., BOLTOVSKOY, D. and CATALDO, D., 2006. Tasas de clareado: ritmos e impacto. In UTERMANN, Caroline et al. Combined genotyping, microbial diversity and metabolite profiling studies on farmed *Mytilus* spp. from Kiel Fjord. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

VEZZULLI, Luigi et al. Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the *Mediterranean mussel* (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 495-504, 2018.

SUI, Yanming et al. Antioxidant response of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus* exposed to reduced pH and oxygen concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, p. 94-102, 2017.

YUAN, Xin et al. *Arenimonas maotaiensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_12, p. 3994-4000, 2014.

ZHAO, Jing et al. Effects of dietary supplementation of probiotics on growth, immune responses, and gut microbiome of the abalone *Haliotis diversicolor*. **Aquaculture**, v. 493, p. 289-295, 2018.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1:

Reservatório	Coordenadas Geográficas	
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W
UHE Barra Grande	27° 46' 45" S	51° 11' 05" W
UHE Campos Novos	27° 37' 21,3" S	51° 07' 53,1 W
UHE Campos Novos	27° 36' 19,6" S	51° 13' 16,5" W
UHE Campos Novos	27° 36' 19,6" S	51° 13' 16,5" W
UHE Machadinho	27° 31' 01,3" S	51° 37' 23,6" W
UHE Machadinho	27° 30' 12" S	51° 40' 37,5" W
UHE Machadinho	27° 31' 23,1" S	51° 46' 54,9" W
UHE Itá	27° 28' 56" S	52° 38' 30" W
UHE Itá	27° 31' 24" S	51° 10' 75" W
UHE Itá	27° 27' 26,1" S	51° 53' 22" W
UHE Foz do Chapecó	27° 10' 05" S	52° 51' 33" W
UHE Foz do Chapecó	27° 10' 24" S	52° 52' 24" W
UHE Foz do Chapecó	27° 08' 50" S	53° 02' 22,1" W

3 CONCLUSÃO GERAL

No Artigo 1, foi possível observar que a microbiota digestiva do *Limnoperna fortunei* presente nos reservatórios de UHE do alto Rio Uruguai possuem uma microbiota que se diferencia entre os pontos coletados, com variações de composição do trato digestivo, constatando a presença dos Gêneros de bactérias *Dorea*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Aeromonas*, sugerindo que o *L. fortunei* bioacumula bactérias com potencial patogênico de risco para saúde humana e a de peixes. No entanto, há necessidade estudos adicionais como isolamento bacteriano, ensaios com a utilização dessas bactérias *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial patogênico desses Gêneros de microrganismos presentes na microbiota do trato intestinal do mexilhão-dourado. Outro estudo adicional sugerido é o monitoramento para detecção e quantificação desses microrganismos e se a sazonalidade influencia na concentração desses microrganismos. A adição dos mesmos estudos incluindo outros fatores como microbiota presente no solo e água, para verificar a influências destes e a variação da concentração no *L. fortunei*.

No Artigo 2, foi possível verificar que a microbiota digestiva do *L. fortunei* se diferencia entre as estações do apresentando maior riqueza e diversidade bacteriana em amostras do verão, que possuía a temperatura significativamente mais elevada do que no inverno, não havendo diferença entre os filos dominantes. Além disso, foi possível identificar 142 OTUs compartilhadas entre as amostras digestivas do inverno e verão que não sofreram influência do período coletado, indicaram a formação de uma *core microbiota*. Para constatação desse fenômeno, há necessidade de inserir análise de Metagenômica, de forma mais abrangente, a fim de compreender amostras coletadas ao longo das estações do ano.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AGOSTINHO, Ângelo A.; THOMAZ, SIDINEI M.; GOMES, LUIZ C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- AGOSTINHO, Ângelo A.; THOMAZ, SIDINEI M.; GOMES, LUIZ C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- ANDRADE, Lidiana et al. Influência de nitrogênio amoniacal e vazão de ar no processo de nitrificação, etapa de tratamento de efluente de abatedouro de peixe. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 1, p. 160-167, 2010.
- AVELAR, W. E. P.; MARTIM, S. L.; VIANNA, M. P. A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856)(Bivalvia, Mytilidae) in the State of São Paulo, Brazil Nova ocorrência de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1856)(Bivalvia, Mytilidae) para o Estado de São Paulo, Brasil. 2004.
- AZEVEDO, R. V. et al. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 2016.
- BELZ, Carlos Eduardo et al. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em reservatórios e sistemas de usinas hidrelétricas da Companhia Paranaense de Energia–Copel. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 27, n. 2, p. 123-126, 2005.
- BRIGGS, John C. Marine biogeography and ecology: invasions and introductions. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 2, p. 193-198, 2007.
- CARLTON, James T. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. **Oceanography and Marine Biology**, v. 23, p. 313-371, 1985.
- CARNEIRO, D. A.; GARIGLIO, L. P. A biorremediação como ferramenta para descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Tecer**, v. 3, n. 4, p. 82-95, 2010.
- CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 430-438, 2006.
- COLLYER, Wesley. Água de lastro, bioinvasão e resposta internacional. **Revista Jurídica da Presidência**, v. 9, n. 84, p. 145-160, 2007.
- COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 345, n. 1311, p. 101-118, 1994.
- DARRIGRAN, Gustavo. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. **Biological Invasions**, v. 4, n. 1, p. 145-156, 2002.
- DE OLIVEIRA, M. D. et al. Área de ocorrência do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) na bacia do Alto Paraguai, entre os anos de 1998 e 2004. 2004.

- DE SOUZA, Rosa Cristina Corrêa Luz; DA COSTA FERNANDES, Flavio; DA SILVA, Edson Pereira. A study on the occurrence of the brown mussel *Perna perna* on the sambaquis of the Brazilian coast. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, n. 13, p. 3-24, 2003.
- DIAS, S. C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 373-379, 2004.
- DIEZ-ECHAVE, P. et al. Probiotic and Functional Properties of *Limosilactobacillus reuteri* INIA P572. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1860, 2021.
- ELALA, N. M. A.; RAGAA, N. M. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 4, p. 621-629, 2015.
- ELTON C. S. **The ecology of invasions by animals and plants**. London: Methuen, 1958.
Disponível em:
<http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=4DBDiFeavyUC&oi=fnd&pg=PR7&q=ELTON+C.+S.+The+ecology+of+invasions+by+animals+and+plants.+London:+Methuen,+1958.&ots=IUOPID2z2J&sig=6f_t79QmpaStwE2DIIN0eKRBHfk#v=onepage&q&f=false>
Acessado em 23/05/2022.
- GADD, Geoffrey M.; WHITE, C. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. **Special publications of the Society for General Microbiology**, 1989.
- GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. **Aquaculture**, v. 448, p. 464-475, 2015.
- GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 289-299, 2008.
- GISP – Programa Global de Espécies Invasoras. América do Sul invadida: a crescente ameaça das espécies exóticas invasoras. **Gisp**, p. 80. 2005.
- GODINHO, A.L. **Peixes do Parque Estadual do Rio Doce**. Instituto Estadual de Florestas e Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, p. 48. 1996.
- GODINHO, Alexandre L. Peixes do Parque Estadual do Rio Doce. **Belo Horizonte: Instituto Estadual de Florestas/Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 1, p. 48, 1996.
- GOLLASCH, Stephan. The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. 2002.
- GOMES, A. P. P. et al. Efeitos de duas décadas de peixes exóticos na Lagoa Carioca, Parque Estadual do Rio Doce, MG. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu—MG**. 2007. p. 1-2.
- GOMES, A. P. P. et al. Efeitos de duas décadas de peixes exóticos na Lagoa Carioca, Parque Estadual do Rio Doce, MG. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu—MG**. 2007. p. 1-2.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, p. 259-270. 2000.

HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R., PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, n.1, p. 1-21, 1998.

HINDU, S. V. et al. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227-238, 2018.

HOLZAPFEL, Wilhelm H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365s-373s, 2001.

IBAMA. **Espécies exóticas invasoras**: situação brasileira/Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. – Brasília: MMA, p. 24. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Plano nacional de prevenção, controle e monitoramento do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2020. 150 p.

ITO, Kenji. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in Japan. In: *Limnoperna fortunei*. Springer, Cham, 2015. p. 321-332.

JAISWAL, E. et al. Isolation and Characterization of Microorganisms from Edible Bivalves as Potential Agents for Bioremediation. **Journal Of Ecophysiology And Occupational Health**, v. 14, n. 3-4, p. 149, 2014.

JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

KUREK, E.; CZOBAN, J.; BOLLAG, J. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1011-1015, 1982.

LACERDA, F.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. **Biorremediação**: educação em saúde e alternativas à poluição ambiental. Natal: Editora IFRN, 2019. 80 p.

LA-FUENTE, M.; FAÚNDEZ, V. Evaluación in vitro de bacterias marinas para potencial biocontrol en cultivo de moluscos bivalvos. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 54, n. 3, p. 272-282, 2020.

LA-FUENTE, M.; MIRANDA, C.; FAÚNDEZ, V. Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile: avances y perspectivas. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 50, n. 1, p. 01-12, 2015.

LIM, H. J. et al. Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: isolation and screening for bioactivity. **Journal Of Shellfish Research**, v. 30, n. 3, p. 609-615, 2011.

LIMA, D. F.; BENEDITTO, A. P. M.; FRANCO, R. W. A. Bivalves como biomonitorios ambientais: uma revisão de literatura. **Conjecturas**, v. 22, n. 2, p. 1142-1156, 2022.

LODGE, David M. et al. Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: challenges in spatial scaling. **Australian journal of ecology**, v. 23, n. 1, p. 53-67, 1998.

MALLMANN, V. et al. As Vantagens da Biorremediação na Qualidade Ambiental. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 1, p. 12, 2019.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and Characterization of Engine Oil Degrading Indigenous Microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 23-27, 2007.

MANSUR, Maria Cristina Dreher et al. Prováveis vias da introdução de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) na bacia da laguna dos Patos, Rio Grande do Sul e novos registros de invasão no Brasil pelas bacias do Paraná e Paraguai. **Água de lastro e bioinvasão**, 2004.

MARGARIDO, S. S. O. et al. Prospecção de bactérias produtoras de plásticos biodegradáveis na região sudoeste da Amazônia. **Biologia: Ensino, Pesquisa e Extensão**, p. 178-187, 2021.

MARIANO, Adriano Pinto. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006.

MCKINNEY, M. L.; LOCKWOOD, J. L. Community composition and homogenization: evenness and abundance of native and exotic plant species. **Species invasions—insight into ecology, evolution and biogeography**. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, p. 365-380, 2005.

MENEGHETTI, Liliane Rebechi Ribeiro et al. Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. 2007.

MERRIFIELD, D. L. et al. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 73-79, 2011.

MERRIFIELD, D. L. et al. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. **Aquaculture Research**, p. 1268-1272, 2009.

MODESTO, G. A. et al. Utilização de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) no tratamento dos efluentes do cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). **Pan-American Journal Of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 3, p. 367-375, 2010.

MOLLOY, Daniel P. et al. Mode of action of *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: Dreissenidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 115-121, 2013.

- MOURA, S.C. et al. *Xilanases microbianas* e suas aplicações industriais. Brasília: **Embrapa Agroenergia**, 2021. 52 p.
- NASCIMENTO, F. L.; CATELLA, A. C.; MORAES, A. S. Distribuição espacial do tucunare, *Cichla* sp (*Pisces, cichlidae*), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. 2001.
- NISC - National Invasive Species Council. **Meeting the Invasive Species Challenge: National Invasive Species Management Plan**. 90 pp. 2012. Disponível em: <<http://www.invasivespecies.gov/>>. Acessado em 20/04/2021.
- OLIVEIRA, M. D. Fatores reguladores e distribuição potencial do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei* Dunker 1857) na bacia do alto rio Paraguai e outros rios brasileiros. 2009. **UFMG. 100p**, 2009.
- OLIVEIRA, V.M. et al. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, v.7, p. 1-19, 2006.
- PANDIYAN, P. et al. Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 1, p. 55-59, 2013.
- PANGHAL, A. et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80-89, 2018.
- PASTORINO, Guido et al. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. 1993.
- PEREIRA, A. M. L. et al. **O uso de ostras na biorremediação de efluentes da aquicultura**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 22 p.
- PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismo para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Ele. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.
- PEREIRA, D. **Bivalves Límnicos na América do Sul: subsídios para conservação de espécies nativas e para o controle do bivalve invasor *limnoperna fortunei* (dunker, 1857)**. 2014. 304 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência, A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- PESTANA, D.; PIE, M.R.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W.A.; ANDREOLI, C.V.; TAKEDA, A.M.; FUJITA, D.S.; MELO, S.M.; IBARRA, J.M.; BUTAKKA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.P.; BRAGA, C.P.; FUJITA, R.; ROSIN, G.C. & FERNANDES, S.P.F. 2003b. Comunidade Zoobentônica Relatório 2003. **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. Programa PELD/CNPq. Disponível em: <<http://www.peld.uem.br/Relat2003/pdf/Zoobentos.pdf>>. Acesso em: 16/Set./2009.
- PYŠEK, Petr et al. Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 5, p. 237-244, 2008.
- PYŠEK, Petr et al. Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 5, p. 237-244, 2008.

- QUEIROZ, J. F.; BOEIRA, R. C. **Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo o acúmulo de amônia em viveiros de aquicultura**. Jaraguá: Embrapa, 2007. P. 5.
- RAMLUCKEN, U. et al. Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in poultry. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00575, 2021.
- REIS, S. S. O. et al. Bioprospecção de bacterias produtoras de polihidroxicanoatos a partir de óleo de andiroba / Bioprospecting of bacteria producing polyhydroxyalkanoates from andiroba oil. **Brazilian Journal Of Development**, v. 7, n. 11, p. 102581-102589, 2021.
- REUTER, G. Probiotics--possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. **Europe PCM**, v. 114, n. 12, p. 410-419, 2001.
- RIBEIRO, P. A. P.; COSTA, L. S.; LOGATO, P. V. R. Probióticos na aquicultura. **Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 837-846, 2008.
- RICCIARDI, Anthony; NEVES, Richard J.; RASMUSSEN, Joseph B. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionoida) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. **Journal of animal ecology**, v. 67, n. 4, p. 613-619, 1998.
- RINGØ, E. et al. Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-37, 2018.
- RIVERA, Irma NG et al. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 599-606, 2003.
- ROSA, A. P.; TRIGUIS, J. A. Estudos experimentais de análise do processo de biorremediação na mitigação do impacto ambiental. **Geochemia Brasiliensis**, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2006.
- SILVA, B. C. et al. **Probióticos na Piscicultura**. In: PEREIRA, G. R. et al (org.). Piscicultura continental com enfoque ecológico. Gaspar: Publicação do IFSC, 2016. p. 323.
- SOUZA, R. C. C. L.; FERNANDES, F. C.; SILVA, E. P. Distribuição atual do mexilhão *Perna perna* no mundo: um caso recente de bioinvasão. Água de lastro e bioinvasão. Interciência, Rio de Janeiro, p. 157-172, 2004.
- SOUZA, R. C. C. L.; SILVA, E. P.; FERNANDES, F. C. Sambaqui: um baú de preciosas informações. **Ciência Hoje**, v. 214, p. 72-74, 2005.
- SOUZA, R.C.C.L., FERREIRA, C.E.L. & PEREIRA, R.C. **Bioinvasão Marinha**. In: Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (Org.). Biologia marinha, 2ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. (no prelo).
- SOUZA, Rosa Cristina Corrêa Luz de; CALAZANS, Sálvio Henrique; SILVA, Edson Pereira. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e cultura**, v. 61, n. 1, p. 35-41, 2009.

STACHOWICZ, J. J.; WHITLATCH, R. B.; OSMAN, R. W. Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. **Science**, 286: 1577-1579. 1999. Disponível em: <<http://noss.cos.ucf.edu/papers/Stachowicz%20et%20al%201999.pdf>>. Acessado em 23/05/2022.

TAKEDA, A. M. et al. Ocorrência da espécie invasora de mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), em dois pequenos reservatórios próximos a Curitiba, PR. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 25, n. 2, p. 251-254, 2003.

TEIXEIRA, Rafael Marques et al. Bioinvasão marinha: os bivalves exóticos de substrato consolidado e suas interações com a comunidade receptora. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 2, p. 381-402, 2010.

USC - Union Concerned Scientists. **The science of invasive species**. 2017. Disponível em: <http://www.ucsusa.org/global_environment/invasive_species/index.cfm>. Acessado em 23/05/2022.

VIEIRA, B. B.; PEREIRA, E. L. Potencial dos probióticos para o uso na aquicultura. **Rev. Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1223-1241, 2016.

ZANELLA, O. & MARENDA, L.D. 2002. **Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu**. In: 5 Congresso Latinoamericano de Malacologia, São Paulo. Resumos. Instituto Butantan/Instituto de Biociências, USP, São Paulo, p. 41.

ZHOU, Z. et al. Methodological Approaches Used to Assess Fish Gastrointestinal Communities. In: MERRIFIELD, D. L.; RINGØ, E. (Ed.). **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. UK: Wiley Blackwell, 2014. Cap. 5. p. 101-127.

ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, 2009.