

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

CLÁUDIO MARCOS LAUER JÚNIOR

**Caracterização da microbiota intestinal de *Arctocephalus australis*, *Arctocephalus tropicalis* e *Spheniscus magellanicus***

Porto Alegre  
2019

CLÁUDIO MARCOS LAUER JÚNIOR

**Caracterização da microbiota intestinal de *Arctocephalus australis*, *Arctocephalus tropicalis* e *Spheniscus magellanicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre  
2019

CLÁUDIO MARCOS LAUER JÚNIOR

**Caracterização da microbiota intestinal de *Arctocephalus australis*, *Arctocephalus tropicalis* e *Spheniscus magellanicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

BANCA EXAMINADORA

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Guedes Frazzon  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Fabício Campos  
Universidade Federal do Tocantins

---

Ana Paula Muterle Varela  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Ana Claudia Franco  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus.

À Ana Paula Frazzon, pela orientação, credibilidade, paciência e apoio.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica de Procaríotos, em especial a Bainana e a Mica, ao professor Jeverson Frazzon por me acolher em seu laboratório por um período da minha pesquisa.

À Aline Weber Medeiros por sua ajuda neste trabalho.

Aos amigos de laboratório ICBS, UFRGS.

Aos professores do PPGMAA da UFRGS com quem tive uma grande aprendizagem.

Ao Maurício Tavares do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) pela disponibilidade das amostras e ajuda.

Ao CECLIMAR, em especial ao Derek Blaese.

Por fim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram ou somente torceram para que esse trabalho desse certo.

A todos vocês, meu sincero muito obrigado!

## RESUMO

A microbiota intestinal pode ser composta por organismos procarióticos, eucarióticos e vírus. Esta microbiota é adquirida durante o desenvolvimento de seu hospedeiro. A composição da microbiota intestinal pode proporcionar informações sobre o modo de vida dos hospedeiros, a alimentação, os parasitas e períodos com restrição de alimentos. Até o momento, poucos estudos avaliaram a microbiota intestinal de animais selvagens relacionando a idade e sexo em suas condições naturais. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo gerar dados sobre a microbiota intestinal de animais selvagens recolhidos ao longo do litoral do Rio Grande do Sul. Esta tese apresenta dois capítulos em forma de artigos, sendo o primeiro a avaliação da microbiota eucariótica intestinal de lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*). Para tanto, cinco as amostras de fezes de lobo-marinho-sul-americano (n = 2) (*A. australis*) e lobo-marinho-subantártico (n = 3) (*A. tropicalis*) foram submetidas à extração de DNA. O DNA extraído das amostras foi analisado por meio do sequenciamento parcial do gene de *18S rRNA* utilizando a plataforma de alto desempenho Ion Torrent PGM. Os resultados mostraram que a microbiota eucariótica presente nas fezes dos lobos-marinhos era dominado pelo filo *Chordata* (51,28%) seguido por Nematoda (23,93%) e Platyhelminthes (11,74%). No geral, foi verificado que as comunidades eucarióticas encontradas eram heterogêneas entre os animais. O segundo capítulo, investiga a microbiota bacteriana presente na cloaca do pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). As amostras foram coletadas com suabes cloacais de 20 pinguim-de-Magalhães (*S. magellanicus*). As amostras dos pinguins foram divididas em seis pools de DNA, subsequentemente divididos em dois grupos de animais classificados como sub-condicionados (3 pools de DNA) e como caquéticos (3 pools de DNA) conforme suas massas corpóreas. As amostras de DNA do pinguim-de-Magalhães foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene de *16S rRNA* na plataforma Illumina MiSeq. Os resultados revelaram que o filo Proteobacteria era predominante em ambos os grupos de pinguins sub-condicionados e caquéticos (53.70% e 44.70%), seguido por Firmicutes (16.30% e 23.70%) e Bacteroidetes (17.20% e 16.30%), Actinobacteria (9.10% e 9.80%), respectivamente. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre ambos os grupos. O perfil metabólico apresentou como as vias mais proeminentes em

ambos os grupos: a biossíntese aminoácidos (19.76% e 19.90%), carboidratos (19.04% e 18.99%), metabolismos de cofatores e vitaminas (13.80% e 13.50%) metabolismo energético (12.82 e 12.97%), porém não foram verificadas diferenças significativas entre os dois grupos avaliados. Esta pesquisa forneceu informações para futuros trabalhos sobre a microbiota eucariótica e procariótica nesses hospedeiros. Além disso, identificaram-se complexas comunidades de habitantes do intestino tanto de lobos-marinhos quanto de pinguins selvagens, este estudo também forneceu o primeiro relato sobre a comunidade bacteriana presente na cloaca de pinguins de Magalhães durante o período migração, coletados ao longo da costa norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

**Palavras-chave:** Microbiota, Intestino, Animais selvagens.

## ABSTRACT

The intestinal microbiota may be composed of prokaryotic and eukaryotic organisms. This microbiota is acquired during the development of its host. The composition of the intestinal microbiota may provide information on host lifestyles, diet, parasites and periods with restricted food. Yet, few studies have evaluated the intestinal microbiota of wild animals in their natural conditions. Therefore, the present work had as aim to generate data on the intestinal microbiota of wild animals collected along the coast of Rio Grande do Sul. This thesis presents two chapters in the form of articles, in the first, evaluated the intestinal eukaryotic microbiota in South American fur seals (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) and in the second, evaluated the bacterial microbiota present in the cloaca of the Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). In chapter one, samples of South American fur seals (n = 2) (*A. australis*) and Subantarctic fur seals (*A. tropicalis*) were submitted to DNA extraction. The DNA extracted from the samples was analyzed by the partial sequencing of the 18S rRNA gene using High-throughput sequencing technology of Ion Torrent PGM. The results showed that the eukaryotic microbiota present in fur seals were dominated by the Chordata phylum 51.28% followed by Nematoda 23.93%, Platyhelminthes 11.74%. Overall, the eukaryotic communities found were heterogeneous among the animals. In chapter two, were evaluated 20 cloacal swabs of 20 Magellanic penguins. Penguins samples were divided into six pools of DNA, subsequently divided into two animal groups classified as under-conditioned (3 pools of DNA) and emaciated (3 pools of DNA) according of body weight. Magellanic penguins DNA samples were submitted to sequencing of the 16S rRNA gene by Illumina MiSeq. The results from sequencing of the cloacal microbiota revealed that the phylum Proteobacteria was dominant in both groups of under-conditioned and emaciated penguins (53.70% and 44.70%), followed by Firmicutes (16.30% and 23.70%) and Bacteroidetes (17.20% and 16.30%), Actinobacteria (9.10% and 9.80%), respectively. The results showed not significant differences between both groups. The metabolic profile presented as the most prominent pathways in both groups: amino acid biosynthesis (19.76% and 19.90%), carbohydrates (19.04% and 18.99%), metabolism of cofactors and vitamins (13.80% and 13.50%) energy metabolism (12.82 and 12.97%), however there were no significant differences observed between the two groups evaluated. This

research provided information for future work on the eukaryotic and prokaryotic microbiota in these hosts. In addition, it identified complex communities inhabiting the gut of both sea lions and wild penguins, and this study provided the first report on the bacterial community present in Magellanic penguins during the migration period.

**Keywords:** Microbiota, Gut, Wild Animals.



## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

$\mu\text{M}$	Unidade de medida micromolar
Cm	Unidade de medida centímetro
ddNTPs	Didesoxirribonucleosídeos trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Gb	Giga bases
Kb	Quilo bases
Kg	Unidade de medida quilograma
Km	Unidade de medida quilômetro
mL	unidade de medida mililitro
Ng	Unidade de medida nanograma
°C	Grau Celsius
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
psu	unidade de salinidade prática
RNA	Ácido ribonucleico
SBS	Sequenciamento baseado em síntese
SCFA	Ácido graxo cadeias curtas
TGI	Trato gastrointestinal
U	Unidades
$\mu\text{g}$	Unidade de medida micrograma

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as plataformas de sequenciamento Ion PGM e Illumina MiSeq .....	26
Tabela 2 – Descrição em percentagem da composição bacteriana em amostra fecal de Lobos-marinhos <i>A. australis</i> , <i>A. tropicalis</i> e <i>A. pusillus doriferus</i> .....	36
Tabela 3 – Distribuição taxonômica de família para os vírus em cada espécie de lobo-marinho.....	38

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Contaminação do ovo por bactérias do gênero <i>Samonella</i> .....	19
Figura 2 - Estudos sobre a microbiota intestinal de aves e mamíferos.....	23
Figura 3 - Diagrama genético mostrando a posição relativa dos primers em relação às regiões variáveis.....	24
Figura 4 - Cronograma e comparação de diferentes plataformas comerciais de sequenciamento.....	27
Figura 5 - Divisões dos quatro setores da região costeira do Rio Grande do Sul.....	29
Figura 6 - Representação das correntes que ocorrem no litoral brasileiro e formação da Zona de Convergência Subtropical pela Corrente do Brasil e Corrente das Malvinas.....	31
Figura 7 - Diversidade de procariontes, eucariotos e vírus na microbiota intestinal de lobos marinhos do gênero <i>Arctocephalus</i> .....	35

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL .....	15
2.2 ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	21
2.3 MÉTODOLOGIA DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO DE GENES BACTERIANOS PARA ESTUDO DA MICROBIOTA .....	24
2.4 ANIMAIS MARINHOS PRESENTES NA COSTA BRASILEIRA.....	28
2.5 A DIVERSIDADE DA FAUNA MARINHA NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL .....	28
2.6 PINÍPEDES .....	31
<b>2.6.1 Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.2 Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.3 Microbiota bacteriana intestinal de lobos marinhos do gênero <i>Arctocephalus</i></b> .....	<b>34</b>
<b>2.6.4 Vírus presentes nas fezes de lobos marinhos do gênero <i>Arctocephalus</i></b>	<b>37</b>
<b>2.6.5 Microbiota de eucariotos no intestino de lobos marinhos do gênero <i>Arctocephalus</i></b> .....	<b>38</b>
2.7 PINGUIM-DE-MAGALHÃES ( <i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i> ) .....	39
<b>2.7.1 Microbiota bacteriana em pinguins</b> .....	<b>40</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4 ARTIGOS</b> .....	<b>44</b>
4.1 ARTIGO I.....	44
4.2 ARTIGO II.....	45
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos animais marinhos são encontrados ao longo do litoral do estado do Rio Grande do Sul, em sua grande maioria são animais que estão em seu período migratório e que se afastam centenas de quilômetros de suas colônias ao sul do continente a procura de alimentos. Dentre eles, o lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*), o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) e o pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) usam as praias gaúchas para descansar para depois retornarem ao mar. Porém, muitos dos animais encontrados nas praias se apresentam magros, desidratados, hipotérmicos, doentes ou mortos.

As possíveis causas de morte, doença ou alterações fisiológicas são em sua maioria desconhecidas. Alguns trabalhos relatam infecções causadas por vírus, protozoários e bactérias, em diferentes espécies animais.

O aprimoramento das técnicas de sequenciamento de alto rendimento e com o sequenciamento dos genes *18S rRNA* e *16S rRNA*, tem permitido a identificação de uma grande quantidade de organismos eucarióticos e procarióticos respectivamente, em diferentes amostras. Isso se tornou possível pela presença de regiões hipervariáveis nos genes *18S rRNA* e *16S rRNA*, os quais contém diferentes sequências que permitiram identificar e classificar diferentes microrganismos. Essa técnica permitiu novos estudos tem mostrado a forte influência das comunidades bacterianas intestinais sobre a saúde de seus hospedeiros, pois elas possuem uma série de funções cruciais como: ativação do sistema imunológico, quebra de substratos alimentares e desintoxicação de xenobióticos entre outros.

A relevância de pesquisas que caracterizem a microbiota de animais marinhos selvagens se fundamenta em aspectos como a necessidade de maiores informações sobre a diversidade e a função dos microrganismos intestinais, uma vez que não sabe se estas comunidades bacterianas podem ter influência na produção de energia durante a migração desses animais, ou qual a relação dessas comunidades com a saúde dos hospedeiros e mortalidade. O conhecimento da microbiota presente no intestino de animais marinhos é necessário para um melhor entendimento da verdadeira condição dos animais que chegam às praias do Rio Grande do Sul.

Nesse contexto, o presente estudo avaliou a composição eucariótica presente no intestino de lobo-marinho-sul-americano e lobo-marinho-subantártico, e a

composição bacteriana presente na cloaca do pinguim de Magalhães capturadas no litoral norte do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

Refere-se à microbiota o conjunto de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos, protozoários, e outros organismos eucarióticos, que habitam um determinado ecossistema. Nos últimos anos, houve um crescente interesse sobre a microbiota intestinal e suas comunidades de microrganismos, uma vez, que esta microbiota tem sido associada a uma grande variedade de funções metabólicas importantes (KARLSSON *et al.*, 2013). O intestino é o órgão mais colonizado, com trilhões de microrganismos (LEY *et al.*, 2006; VENTURA *et al.*, 2018).

Os microrganismos presentes no TGI podem influenciar positivamente ou negativamente vários processos biológicos do hospedeiro, o que pode deixá-lo saudável ou enfermo. Sabe-se que a microbiota intestinal tem um importante papel na saúde humana, pois ela contribui na degradação e absorção de nutrientes (VENTURA *et al.*, 2018). Além disso, a microbiota pode proteger seu hospedeiro do contato com microrganismos patogênicos: i) por meio da exclusão competitiva, gerando uma barreira física ocupando os locais de ligação, ii) por consumo de fontes disponíveis de nutrientes, iii), por estimular o hospedeiro a produzir vários compostos antimicrobianos (SEKIROV *et al.*, 2010).

Entre os microrganismos que compõe esta microbiota, as bactérias têm recebido muito destaque. O TGI dos animais é colonizado por diferentes comunidades microbianas, onde até o momento mais de 50 filos já foram descritos, sendo os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria os mais predominantes no intestino saudável de humanos, enquanto que Proteobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria e Verrucomicrobia estão geralmente menos presentes (ECKBURG *et al.*, 2005; KHANNA; TOSH, 2014; LIAUCHONAK *et al.*, 2019; SZYCHLINSKA *et al.*, 2019).

Alterações na microbiota estão diretamente associadas a resultados funcionais negativos na fisiologia do intestino, como inflamação localizada ou alterações no processamento metabólico. Estes eventos são conhecidos como disbiose microbiana, a qual é caracterizada por uma baixa diversidade microbiana (PETERSEN; ROUND, 2014; KRISS *et al.*, 2018).

Diferentes estudos mostram que disbioses microbianas gradativamente estão sendo associadas a uma ampla gama de doenças humanas, incluindo alergias (BISGAARD *et al.*, 2011; BUNYAVANICH *et al.*, 2016), asma (ARRIETA *et al.*, 2015), doença inflamatória intestinal (FERREIRA *et al.*, 2014; GEVERS *et al.*, 2014; TAKAHASHI *et al.*, 2016; NISHINO *et al.*, 2018), síndrome do intestino irritável (LIU *et al.*, 2017), obesidade (SCHWIERTZ *et al.*, 2010) e doença cardiovascular (CUI *et al.*, 2017; JIE *et al.*, 2017; GUZZARD *et al.*, 2018).

Dados de meta-análises empregando o gene 16S *rRNA* de diferentes partes do organismo de animais têm sido realizados para auxiliar no estudo desta microbiota referência (BRUGMAN *et al.*, 2015). Nos últimos anos, dados utilizando técnicas de sequenciamento de NGS tem gerado uma grande discussão entre os pesquisadores sobre o início da colonização do TGI em mamíferos, pois o dogma da esterilidade do intestino intrauterina que anteriormente era amplamente aceito tem sido questionado por recentes observações que confirmam a presença microbiana no mecônio, placenta e líquido amniótico de humanos (AAGAARD *et al.*, 2014; ARDISSONE *et al.*, 2014; BRUGMAN *et al.*, 2015).

Estas descobertas levaram a duas hipóteses de como poderia ocorrer o início da colonização bacteriana em recém-nascidos: (i) “começa ao nascimento” e o ambiente fetal é estéril até o momento do nascer, e o feto possui o intestino estéril e posteriormente será colonizado gradativamente por microrganismos (BARLOW, 2015). (ii) “hipótese da colonização *in utero*” estudos recentes usando técnicas moleculares sugerem a presença de comunidades bacterianas na placenta, líquido amniótico e mecônio de gestantes saudáveis. Essas descobertas apoiam a teoria de que aquisição do microbioma começa no útero (BORGHI *et al.*, 2018; GUZZARD *et al.*, 2018; WILCZYŃSKA *et al.*, 2018). Esta ideia muda fundamentalmente nossa compreensão sobre a aquisição da microbiota intestinal e seu papel no desenvolvimento humano.

Entretanto, a “hipótese da colonização *in utero*” ainda requer mais estudos. Segundo Perez-Muñoz *et al.* (2017) com base em uma revisão de trabalhos anteriormente publicados, concluíram que os argumentos dos trabalhos se apoiavam em evidências extremamente fracas, pois tinham como base estudos que (i) usaram abordagens moleculares com um limite de detecção insuficiente para estudar populações microbianas com a “biomassa baixa”, (ii) careciam de controles



apropriados para contaminação e (iii) não forneceram evidências de viabilidade bacteriana.

Aagaard e colaboradores (2014) relataram que a colonização intestinal por microrganismos pode ocorrer no útero. Porém, esta colonização ocorreria por bactérias que estariam presentes no líquido amniótico e associados a processos infecciosos na gestante.

Apesar de todas estas dúvidas se a colonização do TGI ocorre antes do nascimento, à colonização do TGI após o nascimento já e bem estudada e segundo estes dados pode ser fortemente influenciada primeiramente pelo tipo de nascimento: parto normal ou cesariano. Os recém-nascidos de parto normal são expostos inicialmente a microrganismos presentes na vagina materna durante o parto, enquanto os que nascem por cesariana são expostos inicialmente a microrganismos presentes na pele da mãe e no ambiente hospitalar (PALMER *et al.*, 2007; BARLOW *et al.*, 2015). Imediatamente após o nascimento, o trato gastrointestinal é colonizado rapidamente por bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, tais como *Escherichia coli* e *Streptococcus* spp. (COLOE *et al.*, 1984; MACKIE *et al.*, 1999; AMIT-ROMACH *et al.*, 2004; VAISHAMPAYAN *et al.*, 2010). Após a colonização inicial, as bactérias aeróbias modificam o ambiente do TGI, reduzindo o nível de oxigênio por meio da oxidação/redução. Esse processo cria um ambiente que é altamente favorável para anaeróbios facultativos e obrigatórios (MACKIE *et al.*, 1999; PENDERS *et al.*, 2010), tais como a classe *Clostridia* e os gêneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (MACKIE *et al.*, 1999; DEWAR *et al.*, 2017).

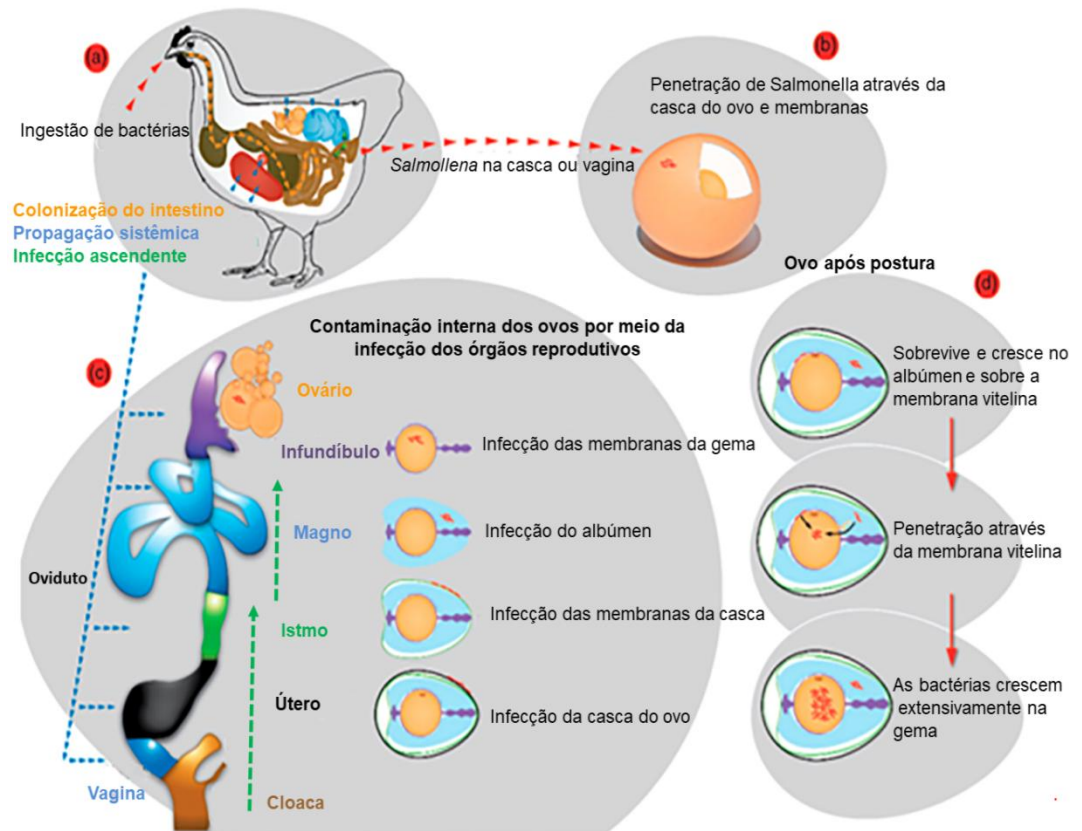
Em aves, os filhotes nascem sem nenhum contato direto com as aves adultas, sendo assim, adquirem sua microbiota intestinal a partir de múltiplas fontes, incluindo a superfície do ovo e o ambiente (ninho) (transmissão horizontal) (LUCAS *et al.*, 2003; APAJALAHTI; KETTUNEN, 2005; GABRIEL *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2005; TOROK *et al.*, 2007; YI *et al.*, 2009). No entanto, evidências recentes sugerem que ovíparos vertebrados como aves e lagartos podem ser capazes de adquirir a microbiota pioneira *in ovo*, e possivelmente a colonização bacteriana ocorreria durante o período de formação dos ovos (TREVELLINE *et al.*, 2018). Conforme o estudo de Trevelline e colaboradores (2018) foram detectados a presença de 13 filos bacterianos em ovos de aves selvagens. Sendo o filo Firmicutes identificado como o mais dominante em ovos de aves (9%), uma vez que a análise mostrou que a maior

parte das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) classificada era de bactérias não identificadas (74%).

Segundo Gantois e colaboradores (2009) a contaminação de ovos por bactérias ocorreria em diferentes fases, e poderia iniciar após ingestão de bactérias pela via oral, por onde estas bactérias entrariam no TGI da ave colonizando o lúmen intestinal. A seguir bactérias como as do gênero *Salmonella* seriam capazes de invadir as células epiteliais intestinais. Em decorrência a essa invasão ao epitélio, (a) células do sistema imune como macrófagos, seriam atraídos para o local da invasão fagocitando as bactérias (figura 1 a). Entretanto, estas bactérias podem sobreviver e se multiplicar no ambiente intracelular dos macrófagos. Esses macrófagos infectados podem migrar para os órgãos internos, como os órgãos reprodutivos (disseminação sistêmica).

Além da disseminação sistêmica, as bactérias também podem acessar o oviduto através da infecção ascendente da cloaca. (b) Uma rota possível de contaminação do ovo por *Salmonella* ocorreria através da penetração da casca e da membrana da casca do ovo após a contaminação exterior do ovo (figura 1 b). A contaminação da superfície pode ser o resultado de infecção da vagina ou contaminação fecal. (c) Outra via de possível contaminação no ovo ocorreria diretamente na gema, membranas da gema, albumina, membranas da casca e casca do ovo ocasionada pela infecção do ovário, infundíbulo, *magno*, istmo e *Útero*, respectivamente (figura 1 c). (d) Além disso, bactérias como a *Salmonella* uma vez presentes no albúmen e na membrana vitelina são capazes de sobreviver e se multiplicar nesse ambiente antibacteriano. Estes microrganismos também são capazes de migrar e penetrar na membrana vitelina para alcançar a gema (figura 1 d). Depois de atingir este ambiente rico em nutrientes, podem se multiplicar abundantemente (GANTOIS *et al.*, 2009) (Figura 1).

**Figura 1 – Contaminação do ovo por bactérias do gênero *Salmonella***



**Fonte: Gantois *et al.* (2009)**

Em recém-nascidos a aquisição de novas comunidades microbianas colonizadoras do TGI ocorre por meio da alimentação. A diversidade de microrganismos intestinal é alterada durante o desenvolvimento a partir dos hábitos alimentares, com a ingestão de outros tipos de alimentos como: frutas, verduras, cereais (KOENIG *et al.*, 2011).

Em humanos, quando ocorre a introdução de alimentos sólidos na dieta entre os seis e doze meses de vida, a composição da microbiota do intestino é modificada, tornando-se similar a de um adulto. Entre as idades de dois e cinco anos os indivíduos já podem alcançar os padrões da microbiota de adultos. Nessa fase pode haver uma menor diversidade interpessoal, embora ainda seja única para cada indivíduo (SCHLOISSNIG *et al.*, 2013; BARLOW *et al.*, 2015). Em adultos, os padrões das populações microbianas são mais constantes na maioria das vezes. Entretanto, essa constância pode ser alterada pelo tipo de dieta, utilização de

probióticos, por doenças ou uso de antibióticos (CLAESSON *et al.*, 2012; O'SULLIVAN *et al.*, 2013).

Igualmente aos eventos de colonização bacteriana do TGI de humanos, a composição da microbiota do TGI de filhotes de mamíferos marinhos é influenciada pela dieta inicial à base de leite (rico em proteínas e lipídios), que mais tarde será substituída por alimentos sólidos, de origem marinha quando forem desmamados (ARNOULD; HINDELL, 1999 e 2002). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa presentes no leite, são os mesmos encontrados no leite humano, promovendo o crescimento de bactérias do ácido lácticas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (DAS, 2002). Segundo Smith *et al.*, (2013) durante os primeiros meses de vida do lobo-marinho (*Arctocephalus pusillus doriferus*) ocorrem mudanças na diversidade filogenética bacteriana com a classe Clostridia dominando aos dois meses e aos nove meses e classe Bacilli aos 6 meses de idade.

Nelson *et al.*, (2013 e 2015) também relatam a importância da dieta e idade como fatores que moldariam a composição da microbiota em foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*), focas-elefante-do-sul (*Mirounga leonine*), focas cinzentas (*Halichoerus grypus*), focas-do-capuz (*Cystophora cristata*), focas (*Phoca vitulina*), focas australianas (*Arctocephalus pusillus doriferus*), leões marinhos australianos (*Neophoca cinerea*), peixes-boi (*Trichechus manatus latirostris*) e dugongo (*Dugong dugong*). Em todas essas espécies, a microbiota intestinal era dominada em grande parte pelos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria.

Nas aves, a necessidade dos filhotes serem alimentados pelos pais, também é um fator com forte influência na colonização microbiana do intestino. Isso ocorre porque os microrganismos são transmitidos via regurgitação de alimentos não digeridos ou parcialmente digeridos aos filhotes (transmissão vertical) (POTTI *et al.*, 2002). Além disso, características corporais de distintas espécies podem oferecer uma ampla variedade de nichos, em que condições tais como temperatura, pH e nível de oxigênio, bem como a disponibilidade nutricional afetam a composição da microbiota do hospedeiro (IKEDA-OHTSUBO *et al.*, 2018).

A microbiota de animais que se alimentam de peixes pode variar, pois a microbiota intestinal dos peixes é altamente diversificada e pode conter diferentes filos, segundo Ikeda-Ohtsubo *et al.* (2018) uma característica em comum entre animais e peixes são os filos: Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria que são as comunidades bacterianas mais abundantes, subsequentemente com uma menor

abundância do filo Actinobacteria, representada frequentemente por as famílias Streptomyetaceae, Microbacteriaceae e Corynebacteriaceae, enquanto os filios Fusobacteria e Acidobacteria representam também importantes grupos bacterianos em animais. (ROESELERS *et al.*, 2011; TARNECKI *et al.*, 2017). Os filios Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomycetes, Spirochaetes e Verrucomicrobia esporadicamente ocorrem como filios subdominantes (IKEDA-OHTSUBO *et al.*, 2018).

Segundo Ikeda-Ohtsubo *et al.*, (2018) no filo Firmiculis a ordem Lactobacillales é uma das mais frequentemente encontrada na microbiota de peixes e animais, porém com algumas variações na dominância de suas famílias (LEVESQUE *et al.*, 2014; VALERIANO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2017), a família Leuconostocaceae que está associada a microbiota de peixes como o Salmão do Atlântico (GAJARDO *et al.*, 2016), e as famílias Enterococcaceae e Streptococcaceae que são geralmente encontrados tanto em microbiota de animais como de peixes (HARDIE; WHILEY, 2003).

## 2.2 ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL

Uma das primeiras técnicas utilizadas para estudo de microrganismos presentes no intestino era baseada em culturas. Porém, as principais desvantagens no uso dessas técnicas seriam a dificuldade de estudar as diferentes colônias, suas características individuais de crescimento em um meio de cultivo (LAGIER *et al.*, 2012 e 2015; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ *et al.*, 2014). Para alguns microrganismos são necessários nutrientes específicos e a concentração deve ser ajustada para o crescimento de cada grupo microbiano. Além de nutrientes, é igualmente necessário que as condições de oxigênio (presença ou ausência), pH e pressão osmótica estejam adequadas ao crescimento dos diferentes microrganismos. Em adição, o isolamento, identificação e enumeração da grande maioria dos microrganismos do trato gastrointestinal usando as técnicas baseadas em cultura convencional é uma tarefa muito laboriosa (LAGIER *et al.*, 2012 e 2015; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ *et al.*, 2014).

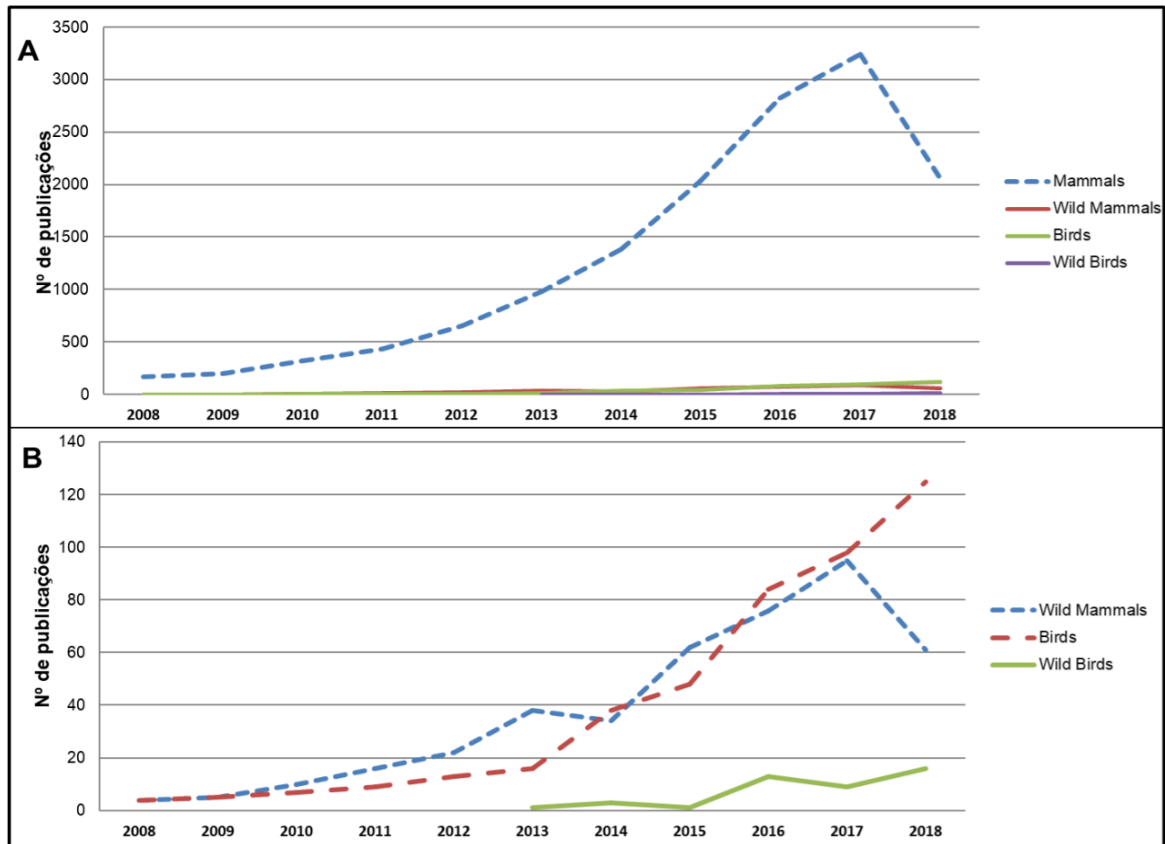
Segundo Jandhyala e colaboradores (2015), usando essas técnicas seria possível avaliar entre 10% a 25% dos microrganismos presentes na microbiota intestinal. E esse baixo número de microrganismos isolados do intestino ocorreria porque a maioria deles é anaeróbia de difícil cultivo. Entretanto, com a melhoria das

técnicas no cultivo de organismos anaeróbios, os principais gêneros identificados foram: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* entre outros (JANDHYALA *et al.*, 2015).

Atualmente, estudos que procuram descrever e entender o papel da microbiota intestinal utilizam a tecnologia de sequenciamento de alto desempenho, que consiste em duas principais etapas: i) amplificação da região ribossômica do gene *16S rRNA* para rastreamento de organismos procariótico e a região do gene *18S rRNA* para organismos eucarióticos e ii) utilização de ferramentas de bioinformática para análise do sequenciamento (JANDHYALA *et al.*, 2015).

Com a eficiência das novas tecnologias de sequenciamento, novos estudos descrevendo a microbiota de diferentes hospedeiros estão tendo uma rápida expansão nos últimos anos, uma vez que a microbiota do trato gastrointestinal (TGI) está associada a tópicos emergentes em microbiologia como: fisiologia do hospedeiro, função imune, ecologia e tratamento especializados na medicina. Apesar da grande diversidade e importância ecológica dos microrganismos, a pesquisa sobre a microbiota intestinal de animais selvagens ainda é escassa. Publicações sobre microbiota intestinal de aves selvagens tem um número muito menor de publicações em relação à pesquisa de mamíferos selvagens. As pesquisas apresentadas na figura 2 usaram descritores como: “*gut microbiota microbiome mammals*”, “*gut microbiota microbiome wild mammals*”, “*gut microbiota microbiome birds*”, “*gut microbiota microbiome wild birds*”, usando o banco de dados *US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed)*, e mostram o número de itens publicados a cada ano entre 2008 a 2018.

**Figura 2 – Estudos sobre a microbiota intestinal de aves e mamíferos. (A) Publicações sobre mamíferos, mamíferos selvagens, aves, aves selvagens. (B) Publicações sobre mamíferos selvagens, aves, aves selvagens.**



Fonte: elaborado pelo autor (2019)

Grond e colaboradores (2018) relataram que mais de 1300 estudos sobre a microbiota de aves foram publicados desde 1948, porém estes estudos se concentram basicamente na influência da dieta na microbiota, nas respostas da microbiota a antibióticos e probióticos, na importância da microbiota na produção de carne em aves de corte. Quanto às aves selvagens, as funções microbianas do intestino permanecem pouco estudadas, apesar de sua relevância para a transmissão de patógenos, e para a compreensão da influência da dieta.

O baixo número de trabalhos publicados sobre microbiota e microbioma de animais selvagens está associado principalmente às dificuldades de capturar e coletar as amostras dos animais em seus ambientes naturais (LEY *et al.*, 2008; YILDIRIM *et al.*, 2010; NELSON, 2012; BANKS *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2014; WELDON *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2016; LAUER-JÚNIOR *et al.*, 2017).

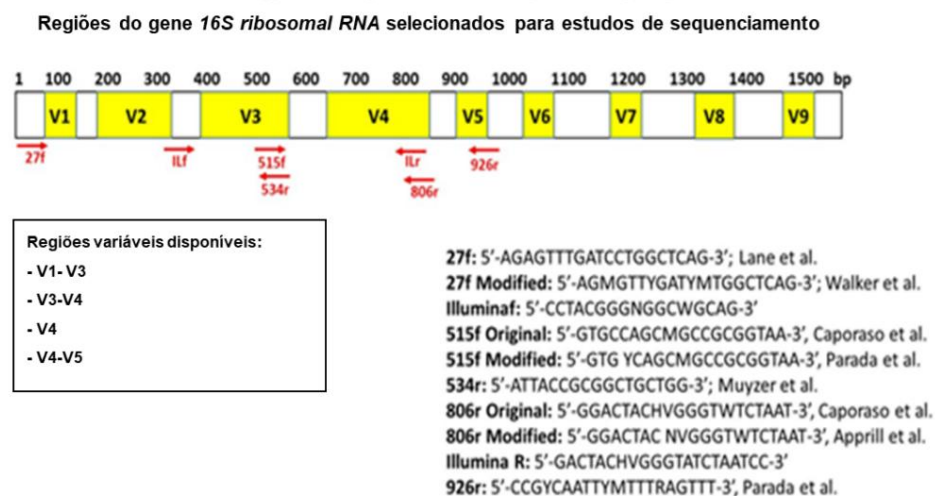
Segundo Nelson e colaboradores, (2012 e 2015) compreender a composição da microbiota intestinal proporcionaria mais informações sobre o modo de vida dos hospedeiros, a alimentação, os parasitas e os períodos com restrição de alimentos.

Diferenças associadas ao tipo de alimentação são uma das principais influências na composição da microbiota intestinal, por exemplo, em mamíferos marinhos carnívoros e mamíferos marinhos herbívoros os filos mais abundantes eram o Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria e Proteobacteria. Curiosamente, a composição da comunidade bacteriana presente no intestino de mamíferos marinhos carnívoros mostrou uma considerável redução na abundância do filo Firmicutes e aumento na abundância do filo Fusobacteria em comparação com mamíferos terrestres. O filo Fusobacteria possui uma grande gama de microrganismos que fermentam carboidratos ou aminoácidos para produzir vários ácidos orgânicos incluindo ácido acético, fórmico e butírico (NELSON *et al.*, 2013).

### 2.3 MÉTODOLOGIA DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO DE GENES BACTERIANOS PARA ESTUDO DA MICROBIOTA

A região bacteriana que codifica o gene *16S rRNA* possui um tamanho pequeno com 1,5 quilo bases (Kb), e é altamente conservada, possuindo 9 regiões hiper-variáveis que são utilizadas para identificar e diferenciar várias espécies de bactérias (PETERSON *et al.*, 2008). As regiões do gene *16S rRNA* mais utilizadas para identificação de espécies bacteriana através das técnicas de sequenciamento são as V3, V4, V6 e V8 (HAMADY *et al.*, 2008) (Figura 3).

**Figura 3 – Diagrama genético mostrando a posição relativa dos *primers* em relação às regiões variáveis**



Fonte: <http://omegabioservices.com/index.php/16s-reference/>



Conforme Jandhyala e colaboradores (2015), a metodologia do sequenciamento de genes evoluiu rapidamente, desde o método desenvolvido por Sanger, Coulson, Maxam e Gilbert em 1977 (SANGER et al., 1977; COULSON e MAXAM, 1977). Inicialmente, ambos os métodos foram igualmente populares entre os pesquisadores, mas com a invenção do termociclador, automação e uso de produtos químicos não perigosos, o método de Sanger tornou-se mais popular (AMBARDAR et al., 2016).

O sequenciamento de Sanger evoluiu para o sequenciamento automatizado de DNA lançado pela empresa Applied Biosystems em 1987, que também é referido como o “sequenciamento de primeira geração”, onde nucleotídeos modificados (ddNTPs) são marcados com corantes fluorescentes específicos que interrompem a polimerização (AMBARDAR et al., 2016).

O sequenciamento de segunda geração surge com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento que melhoraram significativamente tanto o rendimento como o custo. Em meados da década de 2000 vários tipos de plataformas de sequenciamento de segunda geração foram surgindo como o 454 (Life Sciences/Roche diagnostics), seguida em 2006 pelo Genome Analyzer (Criado pela Solexa que posteriormente foi comprada pela Illumina), em 2007 o SOLiD sequencer (Thermo Fisher Scientific) e o Ion Torrent em 2010 (LIU et al., 2012; SCHOLZ et al., 2012; QUAIL et al., 2012; AMBARDAR et al., 2016). Posteriormente, outras plataformas denominadas de bancada foram desenvolvidas, como o Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) e o Illumina MiSeq (LIU et al., 2012). O Illumina MiSeq sequencia amplicons e tem capacidade de realizar as fases de análise de diferentes amostras até a análise dos dados gerados no mesmo equipamento (LIU et al., 2012) (Tabela 1).

**Tabela 1 – Comparação entre as plataformas de sequenciamento Ion PGM e Illumina MiSeq**

	Ion PGM	Illumina MiSeq	Referências
Produção de dados por corrida	10 Gb	13.2–15 Gb	AMBARDAR <i>et al.</i> , 2016
Capacidade de leitura	200 pb	2 x 300 pb	AMBARDAR <i>et al.</i> , 2016
Taxa de erro (%)	1.78	0.8	AMBARDAR <i>et al.</i> , 2016
Método de sequenciamento	Sequenciamento por detecção de íons de hidrogênio	Sequenciamento baseado em síntese (SBS)	AMBARDAR <i>et al.</i> , 2016
Quantidade de material	µg	ng (Nextera)	LIU <i>et al.</i> , 2012
Análises de dados	Fora plataforma (Servidor)	Na própria plataforma	LIU <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Ambardar et al. (2016); Liu et al. (2012)

As plataformas da Illumina para realizar o sequenciamento usam a síntese por meio da enzima DNA polimerase e de nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos (BENTLEY *et al.*, 2008). A ligação das moléculas de DNA ocorre por complementariedade entre adaptadores e as bases presas ao suporte sólido, local onde se encontram os oligonucleotídeos complementares a esses adaptadores, e forma uma estrutura em ponte. As bases são lidas usando uma estratégia de terminação reversível cíclica, que sequencia o filamento molde de um nucleotídeo de cada vez por meio de ciclos progressivos de incorporação de base, lavagem, imagiologia e clivagem (REUTER *et al.*, 2015).

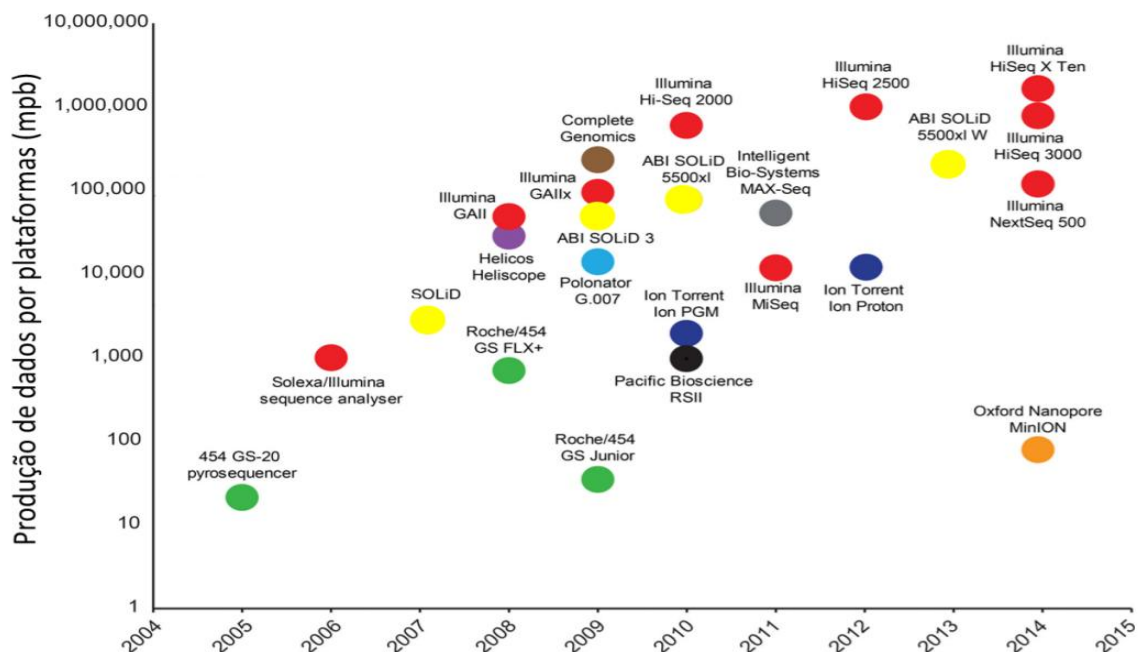
Após o adaptador se unir por complementariedade ao suporte, inicia-se a PCR. Nessa estratégia, usando a extremidade 3' livre, oligonucleotídeo marcados com fluorescência (3'-O-azidomethyl dNTPs) são usados para pausar a reação de polimerização, permitindo a retirada das bases não incorporadas. Subsequentemente por meio de imagens fluorescentes é identificado o nucleotídeo que foi adicionado (GUO *et al.*, 2008; REUTER *et al.*, 2015).

A plataforma de Sequenciamento Ion Torrent desenvolvida e comercializada pela *Life Technologies* segue uma tecnologia de sequenciamento de DNA distinta, pois a identificação das bases ocorre unicamente por diferenças no pH, e não por ddNTPs ou reações luminosas, como em outras tecnologias (REUTER *et al.*, 2015). O sequenciamento utilizando o modelo Ion Torrent necessita de uma PCR de emulsão que é utilizada para amplificar clonalmente fragmentos de DNA ligados a

um adaptador na superfície de pequenas esferas. As esferas são subsequentemente distribuídas em micropoços em um *chip* onde ocorre uma reação de sequenciamento por síntese. A plataforma Ion Torrent mede as mudanças de pH induzidas pela liberação de íons de hidrogênio durante a extensão do DNA (ROTHBERG *et al.*, 2011). Essas alterações de pH são detectadas por um sensor posicionado na parte inferior do micropoço e é convertido em um sinal elétrico. Este sinal é proporcional ao número de bases incorporadas. A cada ciclo de sequenciamento são adicionados nucleotídeos individuais permitindo a identificação das bases (REUTER *et al.*, 2015).

As tecnologias de sequenciamento automatizado evoluíram mostrando um aumento significativo na velocidade do sequenciamento e na diminuição do custo, em 2004 outros tipos de plataformas de sequenciamento de segunda, terceira e quarta geração foram surgindo e sendo utilizadas o para sequenciamento (Figura 4). Entre eles, HiSeq e NextSeq da Illumina, SOLiD da ABI, Helicos<sup>TM</sup>, o sequenciador MinION da Oxford Nanopore, são alguns deles (REUTER *et al.*, 2015).

**Figura 4 – Cronograma e comparação de diferentes plataformas comerciais de sequenciamento**



A figura acima mostra as datas de lançamento comercial versus a produção de dados nos diferentes sequenciadores por execução. As plataformas de sequenciamento são codificadas por cores (adaptado de REUTER *et al.*, 2015).

Atualmente, com diferentes plataformas de sequenciamento de alto desempenho (*Next-Generation Sequencing*, NGS), a tecnologia NGS tem a capacidade de fornecer dados volumosos com uma boa precisão. Porém, essa tecnologia ainda não está totalmente livre de erros (LIU *et al.*, 2012; QUAIL *et al.*, 2012; SCHIRMER *et al.*, 2015).

#### 2.4 ANIMAIS MARINHOS PRESENTES NA COSTA BRASILEIRA

A costa brasileira é a mais extensa área da América do Sul banhada pelo Oceano Atlântico, possuindo uma alta diversidade de animais. Ao norte faz fronteira com a Guiana Francesa, estendendo-se para a sua fronteira sul com o Uruguai no Chuí, apresentando diversos ambientes com diferentes características geomorfológicas e geofísicas (KNOPPERS *et al.*, 1999; DIAZ, 2004; LONGO; AMADO FILHO, 2014).

Quanto à diversidade de aves marinhas, muitas espécies de aves costeiras e marinhas já foram identificadas ao longo da costa brasileira e ilhas oceânicas (MARINI; GARCIA, 2005). A grande maioria dessas aves migra do Hemisfério Norte entre Setembro e Maio, e do extremo sul do continente entre Maio e Agosto, para acasalar e reproduzir em áreas marinhas protegidas como o Atol das Rocas (SICK, 1997; BELLINI *et al.*, 2000).

Mamíferos marinhos são também encontrados na costa brasileira, como animais da ordem Sirenia (peixes-boi) que estão em áreas de mangue nas Regiões Norte e Nordeste. Enquanto a subordem Pinnipedia ocorre com uma frequência maior na região sul do país, perto do Chuí (MILOSLAVICH *et al.*, 2011).

#### 2.5 A DIVERSIDADE DA FAUNA MARINHA NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL

A costa do Rio Grande do Sul estende-se por 620 km entre o Rio Mampituba e o Arroio Chuí, (BELTON, 2000; FEPAM, 2019) variando sua largura entre 10 km ao norte e chegando a 100 km nas proximidades da Laguna dos Patos (RAMBO, 2000). Esta região é caracterizada como a planície costeira mais ampla do país (ABSALONSEN; TOLDO JR., 2007; MULLER; BARROS, 2013). Conforme o Programa de Gerenciamento Costeiro do Rio Grande do Sul (GERCO/RS) o litoral do estado pode ser caracterizado em quatro regiões: 1) Litoral Norte: do município

de Torres até o município de Cidreira; 2) Litoral Médio Leste: do município de Palmares do Sul até São José do Norte, a leste da Laguna dos Patos; 3) Litoral Médio Oeste: do município de Barra do Ribeiro até o de Pelotas, a oeste da Laguna dos Patos; 4) Litoral Sul: do município de Rio Grande até o de Santa Vitória do Palmar (FEPAM, 2019) (Figura 5).

**Figura 5 – Divisões dos quatro setores da região costeira do Rio Grande do Sul**



Fonte: <http://www.fepam.rs.gov.br/programas/gerco.asp>

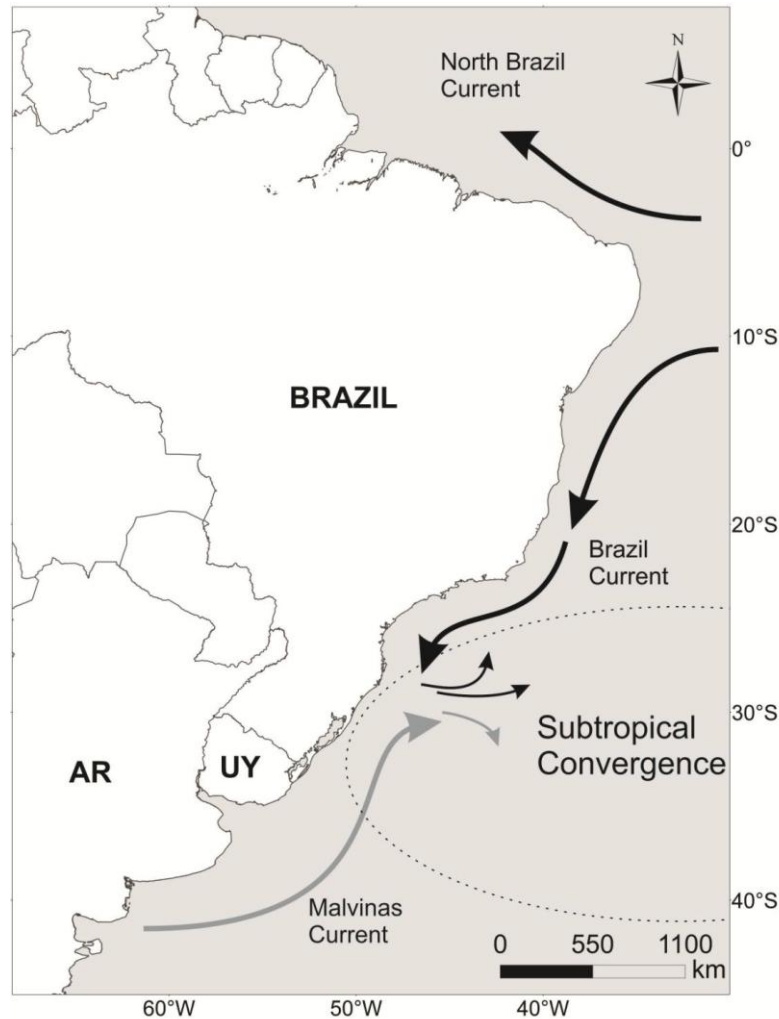
Segundo o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR), o litoral do Rio Grande do Sul possui uma das maiores biodiversidades de fauna marinha e costeira do Atlântico Sul Ocidental, abrigando um grande número de espécies de tetrápodes marinhos. Em meio a essa fauna marinha destacam-se diferentes espécies de tartarugas-marinhas como a tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga-oliva (*Lepidochelys olivácea*) e tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriácea*) (MILOSLAVICH *et al.*, 2011) bem como pinípedes: focas, lobos-marinhos, leões-marinhos e elefantes-marinhos e várias espécies de cetáceos (botos, baleias e golfinhos). Nesta costa também há o registro de 704 espécies de aves, compreendendo desde espécies nativas até as migratórias do hemisfério sul e norte, no qual quase 15% são aves de hábitos marinhos e costeiros (FRANZ *et al.*, 2018; CECLIMAR, 2019).

O litoral gaúcho é uma importante área de reprodução e alimentação de muitos organismos marinhos. Muito dessa biodiversidade pode ser explicada pela

presença da Zona da Convergência Subtropical. Na Costa Gaúcha ocorre o encontro de duas correntes marinhas: a Corrente das Malvinas e a Corrente do Brasil, e esse fenômeno é chamado de Zona de Convergência Subtropical (BERTÊ, 2012). A Corrente do Brasil é caracterizada por possuir a água quente, águas oligotróficas, formadas principalmente por águas tropicais com temperatura de 20 °C, com uma salinidade de 36 psu (SILVEIRA *et al.*, 2000; PORTILHO-RAMOS, 2014). A Corrente das Malvinas é uma corrente fria, e muito rica em nutrientes, que flui para o norte junto à margem continental da Argentina. Essa corrente é derivada de águas subantárticas, cujas temperaturas variam de 5° a 9°C com salinidades entre 33-34 psu e originária da corrente circumpolar antártica (WAINER; VENEGAS, 2002) (Figura 6). Essa zona de transição oceanográfica pode representar o limite norte de espécies características de regiões mais frias ou ainda o limite sul para espécies mais tropicais, além de receber aves migratórias dos dois hemisférios (BERTÊ, 2012).

Segundo Bertê *et al.* (2012) no período do outono, inverno e primavera, muitos animais saem das suas colônias mais ao sul do continente em busca de alimentos. Nesse período, o litoral gaúcho proporciona um importante habitat, de alimentação de muitos organismos marinhos (Zona da Convergência Subtropical) onde há uma grande biodiversidade. Muitos dos animais jovens vivos e outros mortos são encontrados no litoral gaúcho. A presença desses animais neste local está associada a diversos fatores como: 1) o fato de muitos estarem aprendendo a sobreviver sozinhos, 2) alguns animais morrem durante o percurso (essa mortalidade poderia estar associada a sua inexperiência ou por estarem doentes).

**Figura 6 – Representação das correntes que ocorrem no litoral brasileiro e formação da Zona de Convergência Subtropical pela Corrente do Brasil e Corrente das Malvinas**



Fonte: De Amorim (2014)

## 2.6 PINÍPEDES

O termo Pinípede é derivado do *latim*, que significa pés em forma de pena ou asa (pinna = pena; podos = pés). Esse termo faz referência a animais no qual seus membros anteriores e posteriores são modificados em nadadeiras, com membranas interdigitais que auxiliam no seu deslocamento na água (OLIVEIRA, 2013).

Os pinípedes são mamíferos marinhos e estão incluídos dentro da Ordem Carnívora, possuindo adaptações morfológicas e fisiológicas para viver no meio aquático como também na vida terrestre (GERACI e LOUNSBURY, 2005; OLIVEIRA, 2013). Esses mamíferos marinhos atualmente estão distribuídos em três famílias: Odobenidae, composta pelas morsas, as quais ocorrem exclusivamente no hemisfério norte, a família Phocidae, composta pelos elefantes-marinhos, focas e, a

família Otariidae, composta pelos lobos-marinhos e leões-marinhos (PINEDO *et al.*, 1992; Oliveira, 2013).

Na costa brasileira foram registradas sete espécies de pinípedes, entre elas estão o leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*), lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*), lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazela*), lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), foca-caranguejeira (*Lobodon carcinophagus*), foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*) e elefante-marinho-do-sul (*Mirounga leonina*) (CECLIMAR, 2019).

Frequentemente os pinípedes, tais como o lobo-marinho que chegam à costa do Rio Grande do Sul, estão, na maioria das vezes, em seu primeiro ano de vida e são de origem das ilhas rochosas do Uruguai. Apesar do litoral do Rio Grande do Sul ter uma extensão de centenas de quilômetros, apenas dois pontos extremos de parada no mar para os pinípedes são observadas, uma ao sul em Rio Grande e outra ao norte em Torres (BERTÉ *et al.*, 2012)

### **2.6.1 Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*)**

Essa subespécie sul-americana tem sua distribuição ao longo do Atlântico Sul ocidental, sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Ilhas Falkland; também costa do sul do Chile no Pacífico Oriental. No oceano Atlântico, esses animais podem ser encontrados nas rotas do Rio Grande do Sul no Brasil (aproximadamente de 29° a 32° S), embora o limite norte das colônias de reprodução esteja nas Ilhas Del Castillo no Uruguai (34°21'S, 53°44'W) (OLIVEIRA, 2013). Estes animais são encontrados ao longo de toda a costa Argentina, onde se pode observar tanto as colônias de reprodução quanto as de não-reprodução, podendo ser encontradas até na Ilha da Terra Del Fuego-Isla, no extremo sul, incluindo também as Ilhas Falkland. Basicamente, sua distribuição é contínua ao redor da ponta sul da América do Sul até o lado do Pacífico, na Isla Guafo no sul do Chile (43°33'S, 74°51'W) (TÚNEZ *et al.*, 2008; CRESPO *et al.*, 2015).

O lobo-marinho-sul-americano apresenta duas características na sua pelagem, a cor marrom-escura ou marrom acinzentada. Os indivíduos possuem um porte médio. Os machos adultos chegam a atingir o comprimento de até 200 cm e sua massa corpórea pode chegar a 200 kg, enquanto as fêmeas apresentam um



tamanho menor, e raramente conseguem ultrapassar o comprimento de 140 cm e 60 kg (OLIVEIRA, 2013).

A dieta desses animais é composta principalmente de peixes teleósteos (*Cynoscion guatucupa*, *Trichiurus lepturus*, *Engraulis anchoita*, *Urophycis brasiliensis* e *Anchoa mitchilli*) e cefalópodes (*Loligo sanpaulensis* e *Argonauta nodosa*) (OLIVEIRA, 1995; NAYA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2008; DE AMORIM, 2014).

Quanto à reprodução, assim como outros pínípedes, o lobo-marinho-sul-americano apresenta seu período reprodutivo durante o verão, que pode variar entre dois e três meses para os diferentes gêneros da Ordem Pinnipedia. Durante o período reprodutivo formam colônias na costa Atlântica da Argentina e do Uruguai, onde os machos de *A. australis* constituem haréns que podem alcançar uma proporção de um macho para 13 fêmeas (VAZ-FERREIRA, 1965; DE AMORIM, 2014).

### **2.6.2 Lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*)**

A distribuição do lobo-marinho-subantártico ocorre ao norte da Antártica (entre 10 °W e 170 °E) abrangendo as ilhas oceânicas do Atlântico e do Índico (BEAUPLÉ *et al.*, 2004; DREHMER, 2005). Suas colônias reprodutivas são encontradas em sete diferentes locais: na ilha de Gough, que é responsável por cerca de dois terços dos nascimentos de filhotes (BESTER *et al.*, 2006), nas ilhas de Prince Edward aproximadamente um quarto (WEGE *et al.*, 2016), e o restante dos nascimentos ocorrem na Ilha de Amsterd, Ilha Tristão da Cunha, Ilha Crozet, Ilha St. Paul e Ilha Macquarie (GUINET *et al.*, 1994; LANCASTER *et al.*, 2006). Além desses, locais, alguns animais vagantes são registrados comumente em locais distantes, alcançando a Antártica, América do Sul, África do Sul, Madagascar, Austrália e Nova Zelândia (FERREIRA *et al.*, 2008).

Os machos adultos podem medir entre 180-200 cm e pesar 160 kg, e as fêmeas entre 135-150 cm de comprimento total e pesar entre 50 e 55 kg. A maturidade sexual é atingida entre quatro a seis anos para as fêmeas, e quatro a oito anos para os machos, porém frequentemente a reprodução pode ocorrer após os nove anos de idade (BESTER, 1987; OLIVEIRA, 2013).

As buscas por forrageamento geralmente estendem-se a centenas de quilômetros de sua ilha natal. Estes animais alimentam-se oportunamente de

várias espécies de peixes, e em menor grau, cefalópodes e crustáceos. Dentre as espécies de peixes mais abundantes foram *Gymnoscopelus piabilis*, *G. fraseri* e *Electrona carlsbergi* sendo as presas mais comuns. Em menor número outras famílias de peixes foram identificadas como parte da dieta deste lobo-marinho: a Channichthyidae, Paralepididae, Nototheniidae, Microstomatidae e Notosudidae (HOFMEYR e BESTER, 2018).

A reprodução do *A. tropicalis* ocorre durante os meses de verão (Novembro a Janeiro), quando os indivíduos se reúnem nas colônias reprodutivas. Os machos chegam primeiro, estabelecendo territórios por uma combinação de postura, vocalizações e combates. A gestação desta espécie é de 360 dias (BESTER, 1995; HOFMEYR; BESTER, 2018).

### **2.6.3 Microbiota bacteriana intestinal de lobos marinhos do gênero**

#### ***Arctocephalus***

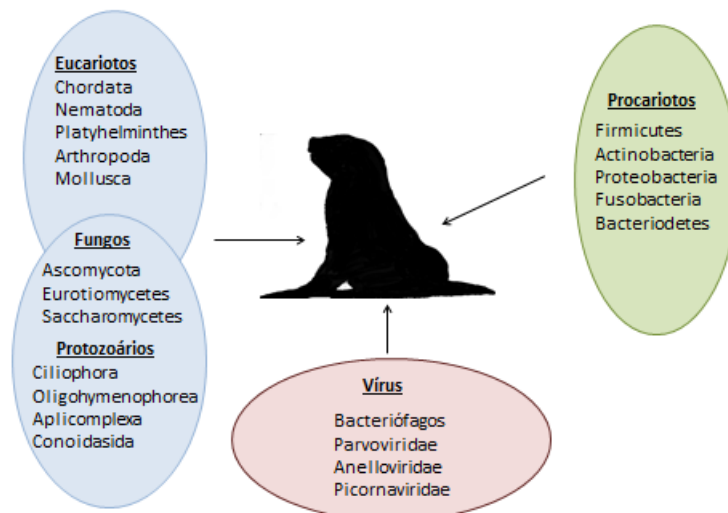
A partir dos anos 2000, com a introdução de técnicas de sequenciamento de alto desempenho baseadas na amplificação do gene *16S rRNA*, houve um aumento na compreensão sobre a diversidade e as relações filogenéticas entre os microrganismos presentes na microbiota intestinal (LAGIER *et al.*, 2012; HUGON *et al.*, 2017). Entretanto, há uma crescente necessidade de evidências quanto à relação entre hospedeiro e sua microbiota intestinal, uma vez que essa relação é extremamente complexa, pois esse ecossistema é composto por organismos procarióticos, vírus, protozoários, fungos e parasitas (HUGON *et al.*, 2017; LAUER-JÚNIOR *et al.*, 2017).

As bactérias, quando associadas à microbiota de seus hospedeiros podem ser organismos comensais ou mesmo benéficas, suas populações podem variar conforme a fisiologia e o metabolismo do hospedeiro (PAMER, 2007; NELSON *et al.*, 2015). Contudo, em mamíferos, as doenças bacterianas podem ocorrer por diferentes circunstâncias, mas principalmente acontecem em ocasiões onde o sistema imunológico do hospedeiro está comprometido. Para mamíferos marinhos, a suscetibilidade a patógenos pode ser particularmente elevada devido a estressores antropogênicos, como recursos alimentares esgotados, degradação do habitat, ingestão de derivados de plástico, exposição química ou sonora (MOS *et al.*, 2006; KANNAN *et al.*, 2007; KIGHT; SWADDLE, 2011; FAIR *et al.*, 2013; DENUNCIO *et*

*al.*, 2017). Além disso, eventos de sucessão microbiana intestinal inicial após uma infecção bacteriana, assim como a ingestão de micro-plásticos podem levar a disbiose (KLEPAC-CERAJ *et al.*, 2010; NELSON *et al.*, 2015. JIN *et al.*, 2019).

Esforços recentes com a finalidade de caracterizar a composição microbiana intestinal do Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e do Lobo-marinho subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) foram realizados em animais encontrados ao longo do litoral do Estado do Rio Grande do Sul (MEDEIROS *et al.*, 2016; KLUGE *et al.*, 2016; LAUER-JÚNIOR *et al.*, 2017) (Figura 7).

**Figura 1 – Diversidade de procariontes, eucariotos e vírus na microbiota intestinal de lobos marinhos do gênero *Arctocephalus***



Fonte: elaborado pelo autor (2019)

Em relação à diversidade procariótica em lobos-marinhos do gênero *Arctocephalus*, Medeiros *et al.* (2016) usando sequenciamento de alto desempenho, avaliaram a comunidade bacteriana presentes em amostra fecais de dez lobos-marinhos jovens, sendo seis *A. australis* e quatro *A. tropicalis* que foram encontrados mortos ao longo da costa do Rio Grande do Sul. Seus resultados identificaram cinco diferentes filos procarióticos como dominantes: Firmicutes, Actinobacterias, Proteobacterias, Fusobacteria e Bacteroidetes (Tabela 2).

Em outro estudo com envolvendo o gênero *Arctocephalus*, Smith *et al.* (2013), investigaram a microbiota intestinal de focas australianas (*Arctocephalus pusillus doriferus*) utilizando amostras fecais, de animais com diferentes idades utilizando hibridização Fluorescente In Situ (FISH) e pirosequenciamento do gene *16S rRNA*.

Os resultados do pirosequenciamento indicaram a presença de dez filós Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Planctomycetes e a divisão candidata bacteriana TM7.

**Tabela 2 – Descrição em porcentagem sobre composição bacteriana em amostra fecal de Lobos-marinhos *A. australis*, *A. tropicalis* e *A. pusillus doriferus***

Filo	<i>Arctocephalus australis</i>	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i>
Firmicutes	88,56	84,01	84,3
Actinobacteria	2,56	10,92	2,91
Proteobacteria	6,28	0,40	2,09
Bacteroidetes	0,17	0,16	6,61
Fusobacteria	1,21	< 0,00	0,23
Verrucomicrobia			1,83
Cyanobacteria			0,81
Tenericutes			0,11
Planctomycetes			< 0,00
division TM7			0,02
Unclassified	1,26	4,48	1,07
Nº de animais	6	4	12
Metodologia	S	S	P
Referência	Medeiros et al., (2016)	Medeiros et al., (2016)	Smith et al., (2013)

As metodologias descritas (S) sequenciamento de alto rendimento e (P) pirosequenciamento do gene *16S rRNA*. Fonte: Medeiros et al. (2016); Smith et al. (2013).

O filo Firmicutes foi constituído principalmente da classe Clostridia, sendo dominada pelas famílias Lachnospiraceae, Peptostreptococaceae e Ruminococcaceae nas três espécies de lobo-marinho. Além disso, Smith e colaboradores (2013) observaram um aumento na abundância nas famílias de Lactobacillaceae e Streptococcaceae nos filhotes de lobos-marinhos com seis meses, quando comparados com filhotes com dois e nove meses de idade.

A alta abundância do filo Firmicutes está vinculada à adiposidade, pois este filo é associado com a quebra de carboidratos complexos, polissacarídeos, açúcares e ácidos graxos (FLINT et al., 2008; TAP et al., 2009). Segundo Bibbo e colaboradores (2014), a predominância da classe Clostridia (Firmicutes) presente no intestino está associada a uma forte influência positiva sobre o sistema imunológico do hospedeiro. Uma vez que estes microrganismos estão associados à produção de

propriedades anti-inflamatórias, geradas por seu metabolismo fermentativo de carboidratos e aminoácidos que produzem ácido graxo de cadeias curtas (SCFA) benéficas, acetato, propionato e butirato (SMITH *et al.*, 2013; STEFKA *et al.*, 2014).

Nelson (2012) relata que a diversidade e abundância de microrganismos pode variar entre as regiões adjacentes do TGI de leopardos-marinhos, onde as comunidades bacterianas presentes no cólon e reto eram mais semelhantes entre si do que os presentes em seções do duodeno, jejuno e íleo. Ainda neste estudo, foi confirmada a semelhança entre as comunidades bacterianas residentes no cólon e reto com as em fezes de leopardos-marinhos. Entretanto, os membros da comunidade bacteriana do TGI são usualmente compartilhados entre as diferentes partes do tubo digestivo.

#### **2.6.4 Vírus presentes nas fezes de lobos marinhos do gênero *Arctocephalus***

Quanto aos vírus presente no TGI de lobos marinhos do gênero *Arctocephalus*, Kluge e colaboradores (2016) relatam sobre a comunidade viral presente na microbiota intestinal. A pesquisa avaliou o viroma fecal em lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), que foram encontrados mortos ao longo da costa do estado do Rio Grande do Sul. A investigação utilizou as plataformas Ion Torrent e Illumina para o sequenciamento das amostras, e revelou que o viroma de *A. australis* (89%) e *A. tropicalis* (67%) eram dominados por bacteriófagos (Kluge *et al.*, 2016). Adicionalmente, sequências de membros das famílias Anelloviridae, Parvoviridae e Picornaviridae foram detectadas em ambas as espécies de lobos marinhos. Sequências de picobirnavírus, picornavírus e um tipo de vírus da hepatite foram identificados em *A. australis*. Um rotavírus relacionado ao grupo C, e um novo membro do Sakobuvirus e um sapovirus muito semelhante ao *sapovirus* 1 do leão marinho da Califórnia foram encontrados em *A. tropicalis* (KLUGE *et al.*, 2016) (Tabela 3).

**Tabela 3 – Distribuição taxonômica de família para os vírus em cada espécie de lobo-marinho**

	<i>A. australis</i> %	<i>A. tropicalis</i> %
Bacteriófagos	89	67
Parvoviridae	3	11
Anelloviridae	1	1
Picornaviridae	3	8
Picobirnaviridae	2	
Hepeviridae	0.2	
Reoviridae		5
Caliciviridae		7

Fonte: Kluge *et al.* (2016)

### 2.6.5 Microbiota de eucariotos no intestino de lobos marinhos do gênero *Arctocephalus*

Os pinípedes são um grupo de predadores e a sua dieta desperta curiosidades quanto a sua composição. A maioria das pesquisas sobre este assunto é realizada pela análise e identificação morfológica de resíduos de suas presas (bicos cefalópodes, otólitos e ossos de peixe) em amostras fecais (OLESIUK, 1993; LITTNAN *et al.* 2007). Entretanto, estudos que utilizam métodos relacionados à análise de DNA também são usados para se obter informações sobre a dieta mais detalhada.

Segundo Nelson (2013) a dieta em animais marinhos tem uma grande influência sobre a composição da microbiota do TGI. Neste contexto, os mamíferos de uma forma geral, coevoluíram junto a um ecossistema microbiano intestinal diverso, que inclui eucariotos microbianos (microeucariotos), entre os habitantes ancestrais do intestino (PARFREY *et al.*, 2011). O “Eucariome” microbiano do intestino agrupa todas as formas de vida nucleadas, incluindo os fungos (fungos filamentosos e leveduras), protozoários e parasitas metazoários cestóides, nemátodos e helmintos (LUKES *et al.*, 2015; LAFOREST-LAPOINTE; ARRIETA, 2018).

Nos últimos dois séculos com o desenvolvimento populacional e a colonização de novas áreas anteriormente habitadas apenas por animais selvagens, fizeram com que novas formas de contaminação e dispersão de muitos protozoários e fungos circulassem entre humanos e animais selvagens. Por outro lado, em humanos a diversidade intestinal de protozoários e fungos mudaram drasticamente,

devido a melhoria do saneamento, ao acesso à água potável, às campanhas de “desparasitação”, a melhor higiene pessoal e ao melhor saneamento alimentar (WARGO *et al.*, 2006; SPEICH *et al.*, 2016).

No entanto, poucos estudos sobre a microbiota eucariótica do TGI de pinípedes foram realizados, pois a maioria analisa a microbiota bacteriana. Pesquisas sobre microeucariotos que compõem a microbiota do TGI são escassas e em sua maioria, são informações relacionadas a parasitas ou a relações patogênicas com o hospedeiro. Com esse intuito foi realizado um estudo sobre a microbiota Eucariótica presente no intestino do lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) mostrado no capítulo I.

## 2.7 PINGUIM-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*)

Os pinguim-de-Magalhães pertencem à ordem Sphenisciformes e sua reprodução ocorre na costa atlântica e pacífica da América do Sul. Na Argentina existem 66 locais de reprodução; no Chile exibem pelo menos 31 locais conhecidos e nas Ilhas Falkland (Malvinas), pelo menos 100 locais foram descritos (WOODS; WOODS, 1997, BOERSMA *et al.*, 2013 e 2015). No Oceano Atlântico, durante o inverno a maioria dos indivíduos migra para o norte, para o norte da Argentina, Uruguai ou sul do Brasil, e excepcionalmente para o norte do Brasil (GARCÍA-BORBOROGLU *et al.*, 2010; STOKES *et al.*, 2014). Os pinguins-de-Magalhães que habitam o Pacífico são menos migratórios, porém alguns indivíduos viajam até 1000 km ao norte (SKEWGAR *et al.*, 2014; PÜTZ *et al.*, 2016) e podem ser visitantes raros na costa do Peru (ZAVALAGA; PAREDES, 2009). Os alguns desses viajantes já foram encontrados na Península Antártica (BARBOSA *et al.*, 2007), bem como Austrália e Nova Zelândia (IUCN, 2018).

A reprodução do pinguim-de-Magalhães ocorre nas colônias entre os meses de setembro e março. Na maioria das vezes os pinguins dessa espécie colocam dois ovos de tamanhos similares, com um intervalo médio de um a quatro dias. A incubação dos ovos pode durar de 36 a 44 dias, os filhotes tornam-se independentes aproximadamente entre 60 e 120 dias. Não há um dimorfismo sexual marcante na espécie, porém os machos costumam ser mais robustos que as fêmeas. A

maturidade sexual das fêmeas é alcançada entre 4-5 anos e dos machos entre 6-7 anos (CECLIMAR, 2019).

O pinguim-de-Magalhães pode alcançar 65 cm de altura e 4,5 kg. A dieta desses animais é composta por uma grande variedade de peixes, crustáceos e moluscos (FONSECA *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2007; BALDASSIN *et al.*, 2010). As aves adultas e jovens deixam os locais de nidificação e deslocam-se por correntes oceânicas a procura de alimentos em abundância (FRERE *et al.*, 1996; MÄDER *et al.*, 2010).

### 2.7.1 Microbiota bacteriana em pinguins

Os pinguins são aves dotadas de uma impressionante habilidade de nado, que permite a estas aves ser capazes de percorrer longas distâncias (WILLIAMS, 1995). Estas aves marinhas são amplamente utilizadas como espécies indicadoras biológicas, porque são consumidores de alto nível trófico em cadeias alimentares marinhas e seu status populacional pode ser usado para inferir a condição geral do seu ecossistema (AINLEY *et al.*, 2010; JARMAN *et al.*, 2013). Desse modo, os distúrbios ambientais provocados por atividades humanas, como a pesca comercial, o turismo, a poluição por óleo, a ingestão de plástico e mudanças climáticas afetam diretamente as populações de pinguins (BRANDÃO *et al.*, 2011; BOERSMA; REBSTOCK, 2014; BALDASSIN, 2016).

Assim sendo, pesquisas relacionando a composição microbiana presente no intestino de pinguins e a condição de saúde, desenvolvimento e diversidade bacteriana entre as diferentes espécies dessas aves tem gerado informações para compreender a sua influência sobre estes animais. Uma vez que, se reconhece que a microbiota intestinal desempenha um papel importante na fisiologia digestiva, incluindo extração de energia, metabolismo e armazenamento de gordura destes animais (DEWAR *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2016).

A espécie de pinguim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*) é uma espécie de pinguim que habita a Antártida e segundo Banks e colaboradores (2009) a composição bacteriana fecal deste pinguim apresentava uma abundância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, semelhante à microbiota intestinal de humanos e camundongos. No entanto, ao contrário dos humanos e camundongos o filo



Actinobacteria era o segundo grupo de bactérias mais abundantes nas amostras de fezes do pinguim-de-Adélia com cerca de 30%. Curiosamente, o estudo verificou a ausência do filo Bacteroidetes nas amostras da colônia de Cotter Cliffs e Cape Wheatstone, e a ausência do filo Proteobacteria das amostras de Capes Royds e Wheatstone.

Em outro estudo, foi utilizada a região V2-V3 do gene *16S rRNA* para investigar a microbiota de quatro espécies de pinguins: pinguim-rei (*Aptenodytes patagonicus*), pinguim-gentoo (*Pygoscelis papua*), pinguim-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) e o pinguim-azul (*Eudyptula minor*). Neste estudo as coletas foram feitas quando as aves retornavam de viagens de forrageio durante sua época de reprodução em três locais diferentes: Bird Island na Geórgia do Sul, Baie du *Marine* no Arquipélago de Crozet e Phillip Island na Austrália (DEWAR *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que os filos mais abundantes presentes em todas as quatro espécies de pinguins incluíram os Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Fusobacteria. As quatro espécies de pinguins revelaram diferenças na abundância de cada um dos filos. Os pinguins-gentoo eram dominados pelos filos Fusobacteria (55%), Firmicutes (18%), Proteobacteria (18%) e Bacteroidetes (7%). Os pinguins-rei eram dominados pelos Firmicutes (48%), Fusobacteria (24%) e Bacteroidetes (18%). Os filos dominantes nas amostras do pinguim-azul foram Proteobacteria (30%), Firmicutes (24%), Bacteroidetes (22%), enquanto que os indivíduos da espécie pinguim-macaroni os filos Firmicutes (45%), Proteobacteria (29%) e Bacteroidetes (19%) (DEWAR *et al.*, 2013)

Barbosa e colaboradores (2016) avaliaram diferenças relacionadas à idade e a composição da microbiota do TGI do pinguim-de-barbicha (*Pygoscelis antarctica*) na colônia de pinguins na região de Vapour Col na Ilha de Deception, Antártica. A análise também usou a região V1-V3 do *16S rRNA* para avaliar a microbiota do TGI em amostras de 27 pinguins adultos e 26 jovens. Os filos dominantes foram Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria e Tenericutes. Houve diferenças entre jovens e adultos. Nos jovens o filo mais abundante era o Firmicutes e em adultos o Bacteroidetes. Segundo Barbosa e colaboradores (2016) esta diferença entre os dois grupos estaria relacionada a fatores ambientais e seus pais teriam um importante papel na colonização bacteriana do TGI. Além disso, o autor sugere que os fatores ambientais seriam mais influentes do que os genéticos na composição do TGI dos jovens pinguins-de-

barbicha. No entanto, no estudo é destacada a importância relativa de ambos os fatores e que esta hipótese deveria ser testada através de experimentos.

Infelizmente, as aves selvagens recebem uma menor atenção e, em específico, no caso dos pinguins, poucas espécies tiveram sua microbiota avaliada por técnicas moleculares. Desde 2009, quando Banks e colaboradores (2009) estudaram a microbiota do pinguim-de-adélie apenas cinco trabalhos com esse enfoque foram realizados até o presente momento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as comunidades de eucariotos e procariotos nas fezes e na cloaca de diferentes animais selvagens coletados no Estado do Rio Grande do Sul.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a microbiota eucariótica intestinal do lobo-marinho *Arctocephalus australis* e *Arctocephalus tropicalis*;
- Caracterizar a microbiota procariótica intestinal do pingum *Spheniscus magellanicus*;
- Analisar e comparar microbiota procariótica intestinal do pingum *Spheniscus magellanicus* sub-condicionados e caquéticos.

## 4 ARTIGOS

### 4.1 ARTIGO I

FECAL EUKARYOTIC COMMUNITY OF WILD YOUNG SOUTH AMERICAN  
(*ARCTOCEPHALUS AUSTRALIS*) AND SUBANTARCTIC FUR SEALS  
(*ARCTOCEPHALUS TROPICALIS*)

Artigo publicado na revista *Annals of Marine Biology and Research*.

## 4.2 ARTIGO II

### **Characterization of bacterial microbiota in cloacal of young wild magellanic penguins during their migratory period found along the coast of Rio Grande do Sul**

Artigo submetido ao periódico PLoS ONE.

Cláudio Marcos Lauer Júnior<sup>1,2</sup>, Michele Bertoni Mann<sup>1</sup>, Pabulo Henrique Rampelotto<sup>3</sup>  
Fabiana Quoos Mayer<sup>4</sup>, Ana Paula Mutterle<sup>1</sup>, Derek Blaese de Amorin<sup>5</sup>, Maurício Tavares<sup>5,6</sup>,  
Jeverson Frazzon<sup>7</sup> and Ana Paula Guedes Frazzon<sup>1</sup>

1 Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal of Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

2 Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Feevale, Brazil.

3 Centro de Biotecnologia e PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre / RS – Brasil.

4 Programa de Pós-graduação em Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, Brasil.

5 Centro de Estudos Costeiros Limnológicos e Marinhos (Ceclimar), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

6 Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

7 Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Ana Paula Guedes Frazzon, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500/216, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90050-170, Brazil, Tel: 55215133084505; Email: ana.frazzon@ufrgs.br

## Abstract

The Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are found along the south coast of South America and their population is classified as near threatened. During the migratory period, young and adult animals leave their colonies and migrate thousands of kilometers to the north towards the coasts of Argentina, Uruguay and Brazil following the ocean current movement of the Malvinas' current. During this period, these animals may ingest anthropic material that will influence microbiota composition, thus being these migratory birds excellent indicators to the environmental and health quality of the Ocean life. A diversity of studies already has been performed evaluating the composition of intestinal microbiota of a wide range of animals. However, few studies were realized with wild sea birds. The present we study evaluated the composition of the gastrointestinal microbiota of wild, young Magellanic penguins during migratory period. Samples of cloacal swabs of 20 live wild Magellanic penguins were collected, along the north coast of Rio Grande do Sul. Subsequently penguin samples were divided into six pools of DNA, and separated into two animal groups classified as emaciated (3 pools of DNA) and under-conditioned (3 pools of DNA) according of body weight. The DNA extracted from the samples was analyzed by the partial sequencing of the *16S rRNA* gene using High-throughput sequencing technology Illumina MiSeq. The results showed the Proteobacteria phylum was predominant in both groups of emaciated and under-conditioned penguins (53.70% and 44.70%), followed by Firmicutes (16.30% and 23.70%) and Bacteroidetes (17.20% and 16.30%), Actinobacteria (9.10 and 9.80%) respectively. There were no significant differences between both groups. The metabolic profile presented as the most prominent pathways in both groups: amino acid biosynthesis (19.76% and 19.90%), carbohydrates (19.04% and 18.99%), metabolism of cofactors and vitamins (13.80% and 13.50%) and energy metabolism (12.82 and 12.97%). In the functional community of cloacal microbiota, cluster of orthologous groups (COG), the largest category was "General function prediction only" (mean between COG annotations 10.36%), followed by amino acid transport and metabolism (10.29%), inorganic ion transport and metabolism (8.47%). Although this research has not found significant differences in the composition of the cloacal microbiota between the emaciated and under-conditioned group, it has provided the first description on the bacterial community present in wild Magellanic

penguins during the migratory period, which may be used in future studies to better understand the intestinal microbiota of birds during the migratory period and body condition.

## **Introduction**

Brazil has one of the great marine biomes of the world. The southern coast of Brazil, ranging from southern of Rio de Janeiro state to southern Rio Grande do Sul, is privileged in terms of marine biodiversity, since this area is under the influence of Brazil-Malvinas confluence zone, recognized as one of the most energetic region of water in all oceans. The cold waters of Malvinas current mixes with warmer waters of Brazil current, and this mixture originates a notable thermohaline frontal zone [1-3]. The southern coast is known to be an important nutritional support for seabirds, shorebird, sea turtles, sea lions, dolphins, whales and other marine species, and it is also a resting site for these animals [1].

Several bird species were recorded in southern Brazilian state of Rio Grande do Sul, including shorebirds and seabirds [4-5]. During the winter, a large number of migratory seabirds reach the southern coast of Brazil to feed and rest, however, some of them are malnourished, dehydrated, hypothermic, diseased or oil-covered [6, 7, 11, 12-16]. The most frequently registered migratory seabirds are Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) [6]. These penguins are found in breeding colonies located along the coasts of Chile and Argentina and the Falkland Islands, and after the breeding season, young and adult penguins leave the colonies, went out to sea searching for food, such as fishes, crustaceans and mollusks [7-11]. Since 2004, Magellanic penguins are classified as near threatened according to the International Union for Conservation of Nature [19]. Migratory seabirds have ecological importance, since they are excellent indicators of environmental and oceanic quality. This is because during migration period, these animals can ingested accidentally or together with prey anthropic items, which can provoke unwanted effects in the gastrointestinal tract, impacts on the composition and activity of microbial communities, as well as with the function in immune system and consequently general animal health status [17, 18].

Fecal microbiota diversity, composition and function appear to play an important role in the animal metabolism [20-22]. Microbial communities contribute to synthesis of cofactors, the best example is essential cofactors of animals such as coenzyme B12 (vitamin B12 family), establishment of metabolic pathways, xenobiotic metabolism, and also modulates the host immune functions [23-25]. The microbiota composition is influenced by

several factors, including environment, diet, antibiotics use, stress, ageing, and others, being the environment and diet considered the main drivers of gut microbiota dynamics [26-30].

Many studies have documented the fecal microbial communities of a wide range of animals, however only few studies have evaluated the gut microbiota community in the wild animals, probably due to the migratory habits and/or the difficulty in obtaining samples [31-35]. Dewar *et al.* [36] evaluated the cloacal bacterial community compositions in different species of penguins, such as King (*Aptenodytes patagonicus*), Gentoo (*Pygoscelis papua*), Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) and Little (*Eudyptula minor*). Likewise Banks *et al.* [37] and Barbosa *et al.* [38] investigated the cloacal microbial composition in Adélie (*Pygoscelis adeliae*) and Chinstrap (*Pygoscelis antarcticus*) penguins respectively, from colonies in the Antarctic continent. Differences between penguin species at level of phylum, genus and species were observed, where Firmicutes was the dominant in King, Macaroni, Adélie and Chinstrap penguins; and Fusobacteria and Proteobacteria in Gentoo and Little penguins, respectively [36-38].

Gut microbiome studies in wildlife species highlights two points: i) the understanding of fecal microbial composition and function in wildlife species could assist the process of acclimatization of captive animals and increase their chances to survive a free life; and ii) the analysis of the gut microbiome can point out important aspects related to evolution and ecology of wildlife species. Given these foundations, the goal of this study was to characterize and compare the cloacal microbiota of young wild Magellanic penguins found along the coast of Rio Grande do Sul state, southern Brazil.

## **Material and methods**

### **Cloacal swabs samples collection from young wild Magellanic penguins**

Twenty young (first year of life) wild Magellanic penguins were found alive during their migratory period in 2015 along the coast of Rio Grande do Sul, from Itapeva beach in Torres (29° 20' 07" S; 49° 43' 37" W) to Imbé (29° 58' 31" S; 50° 07' 41" W); and Tramandaí (29° 59' 05" S; 50° 08' 01" W) to Dunas Altas (33° 31' 17" S; 50° 29' 39" W) (Figure 1). All animals were classified into Code 1 (Live animals) as described by Geraci and Lounsbury [39]. The penguins were divided in two groups: Emaciate (1.53 Kg to 1.82 Kg) (n = 10) and Under-conditioned (1.90 Kg to 2.68 Kg) (n = 10) as described by Clements and Sanchez [40].





**Figure 1-** Map showing the location where the young wild Magellanic penguins were found along the coast of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (light gray). The map was produced using Qgis.

Cloacal swabs were collected, transferred to a vial containing Stuart's medium and kept under refrigeration until processing. Samples collection was authorized by the System of Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO) number 20185-4, code number 62966211.

### **Total DNA extraction**

Total DNA was extracted from cloacal swabs using the QIAamp PowerFecal DNA Kit (QUIAGEN) according to the manufacturer's standard protocol. The DNA concentration was determined using the Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, *Massachusetts*, USA) and DNA quality was determined using the NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, *Massachusetts*, USA).

For DNA extraction, cloacal swabs from penguins with similar body mass were mixed (n= 2 or 4 samples), totalizing 6 samples. The swabs were suspended in 2 mL of sterile saline solution 0.85% and maintained under agitation (100 rpm) at 37 °C for 24h and 1.5 mL of solution was used for DNA extraction (Table 1).

**Table 1** - Details of young wild Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) analyzed in this study.

Body Condition	Sample ID	No. of animals	Average mass (kg)
Emaciate	P1	2	1.53 ± 0.025
	P2	4	1.71 ± 0.020
	P3	4	1.82 ± 0.022
Under-conditioned	P4	4	1.90 ± 0.029
	P5	4	2.06 ± 0.054
	P6	2	2.68 ± 0.075
<b>Total</b>		<b>20</b>	

### PCR-amplification of bacterial 16S rRNA genes and sequencing

To characterize the cloacal bacterial composition present in the six pooled samples, fragments of ~500bp the *16S rRNA* gene were amplified using the primers F515 e R806 as described by Caporaso *et al.* [41]. Amplification was performed in a 25 µL mixture consisting of 12.5 µl of genomic DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 1 U *Taq* DNA polymerase, and 1 x reaction buffer. The DNA concentration of product Amplified was checked using a Mastercycler Personal 5332 Thermocycler (Eppendorf®) according to the following program: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 55°C, 1 min at 72°C and a final cycle at 72°C for 6 min. The DNA libraries were prepared for MiSeq system using the 16S Metagenomic sequence library preparation following the manufacturer instructions (Illumina Inc., San Diego, California, EUA).

After, PCR amplicons were purified using Agencourt AMPure XP beads, and library construction was performed following 16S Metagenomic Sequence Library Preparation as described in the Illumina MiSeq. Since all samples were sequenced in paired-end, barcode sequences were used to identify each sample from the total sequencing output. Sequencing

was conducted on an Illumina MiSeq System Personal Genome Machine (PGM) System (Thermo Fisher), following the manufacturer's instructions.

Sequences have been submitted to the NCBI database under accession number (XXXXXXXX). The targeted gene region provides sufficient resolution for the accurate taxonomic classification of microbial sequences.

### **Microbial communities analysis**

The FastQ file exported from the MiSeq System was processed using Mothur v.1.41.1 [42], following an updated version of the pipeline adopted by Rampelotto *et al.* [43]. Initially, sequences were depleted of barcodes and primers (where no mismatch was allowed) and then a quality filter was applied to eliminate reads with one or more ambiguous bases and sequences with homopolymer runs exceeding 6 bp. In addition, the sequences were quality screened using a moving window that was 50-base long. Within that window, any read was removed with an average quality score (inferred as Phred score) below 30. To further de-noise the dataset, sequences were pre-clustered allowing a difference of 1 bp between them using the Mothur implementation of pseudo-single linkage pre-clustering algorithm from Huse *et al.* [44]. All potentially chimeric sequences were identified using VSEARCH [45].

After this initial quality filtering and trimming steps, the remaining sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) based on 97% identity and were classified using SILVA v132 reference database [46]. All Archaea, Eukaryota, Chloroplasts, Mitochondria and unknown reads were removed. The resultant sequences, frequencies and taxonomic assignments were converted to an OTU table in biom format. To reduce spurious OTUs caused by PCR or sequencing errors, an additional filtering step was performed by removing OTUs with less than 5 reads and present in less than 3 samples. The resulting OTU table was normalized using the cumulative sum scaling (CSS) method [47] for microbial community analysis.

QIIME version 1.9.0 was used to estimate alpha and beta diversity [48]. OTU abundances were used to calculate the alpha diversity metrics, including OTU richness, Chao1 richness estimation, Shannon diversity index, and Simpson diversity index. For overall comparison of significant differences among bacterial communities (i.e. beta diversity), principal coordinates analysis (PCoA) was performed. A matrix using phylogenetic (weighted and unweighted Unifrac) and non-phylogenetic (Bray–Curtis dissimilarity) metrics was calculated for each pair of samples. The distances were turned into points in space with the number of dimensions one less than the number of samples. To achieve statistical confidence

for the sample grouping observed by PCoA, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed on the distance matrix.

To compare additional differences among the microbial communities, clustering methods based on Bray–Curtis dissimilarity and Person correlation were performed. The results of hierarchical clustering were visualized using heatmaps and dendrograms. The most prevalent taxa across samples were analyzed with Qiime `compute_core_microbiome.py` at different cut-off values. To detect potential taxa biomarkers, the linear discriminant effect size (LEfSe) method was performed [49]. The algorithm performs a nonparametric factorial Kruskal-Wallis sumrank test and LDA to determine statistically significant different features among taxa and estimates the effect size of the difference. Differences were considered significant for a logarithmic LDA score threshold of  $\pm 1.0$  and a p-value  $< 0.05$  after adjusting for multiple hypotheses testing with the Benjamin–Hochberg method.

### **Metagenome prediction**

Predictive functional gene profiling was based on *16S rRNA* gene sequencing data using Piphillin [50] with updated KEGG database (May 2017) and a confidence cutoff value of 97. Piphillin uses direct nearest-neighbor matching between *16S rRNA* amplicons and genomes to predict the represented genomes. Beta diversity of KEGG orthologs (KO) abundances was calculated using the Bray–Curtis metric. Comparison of functional profiles of each population was performed using PERMANOVA. Differentially abundant features were determined using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe). Benjamini–Hochberg adjusted p-value was calculated to control the false discovery rate (FDR) in multiple testing. The KEGG groups were considered significantly enriched by satisfying an FDR p-value  $\leq 0.05$ .

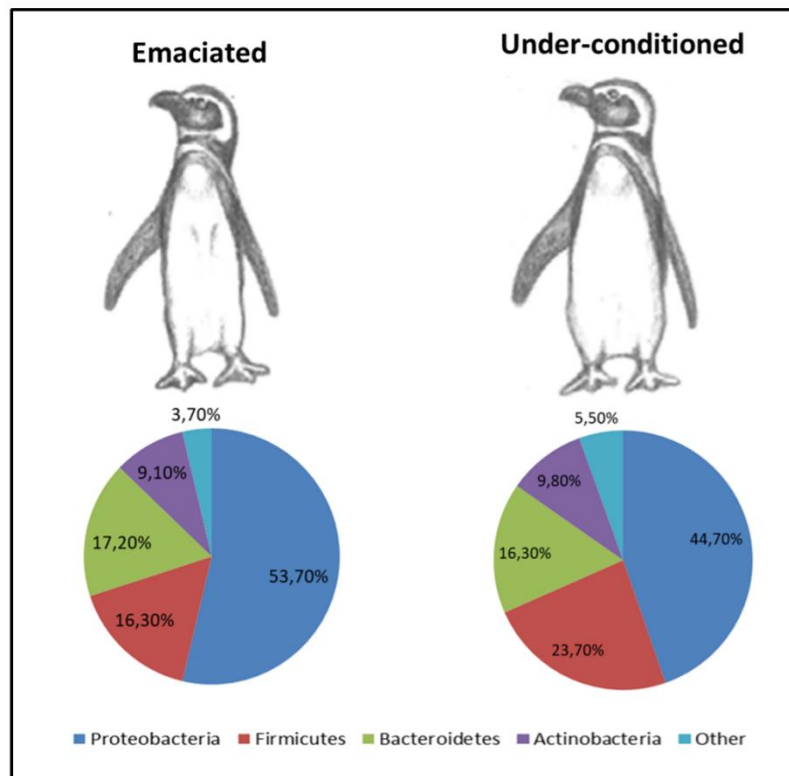
## **Results**

### **Sequencing Results**

A total of 496,171 sequences reads were obtained from the six pooled samples of young wild Magellanic Penguins, from 15.516 to 120.317. The OTUs were clustered at 3% distances and represented a unique phylotype. A total of 593 prokaryotic OTUs were obtained and the number of OTUs detected in each pooled sample ranged from 227 to 308.

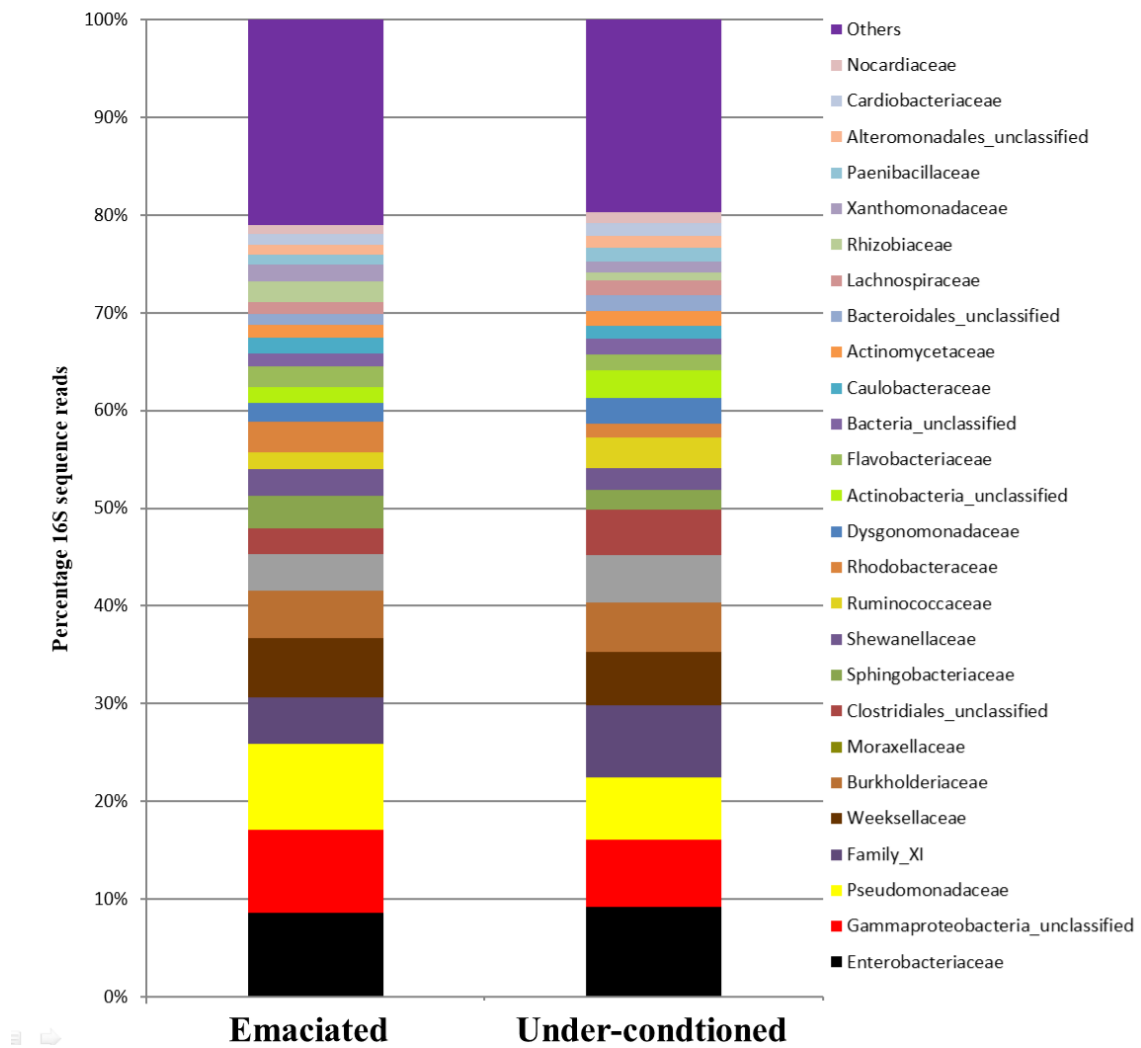
### **Bacterial Taxonomic Composition**

Taxonomic classification of the OTU-representative sequences in cloacal samples of young wild young Magellanic Penguins was characterized into 13 phyla. In relation to these phyla a higher relative abundance between emaciated (E) and under-conditioned (Uc) groups was Proteobacteria (53.7% E and 44.7% Uc), followed by Firmicutes (23.70% E and 16.30% Uc), Bacteroidetes (17.20% E and 16.30% Uc), and Actinobacteria (9.1% E and 9.8% Uc) (Figure 2). The phyla composition was not significantly different from each group of young wild Magellanic Penguins ( $P > 0.05$ ).



**Figure 2.** Average relative abundance of bacterial phyla in the cloaca samples of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins. Other (Phyla with relative abundance smaller than 1% and unclassified). The Magellanic penguins image was adapted from Clements and Sanchez [40].

At the level of bacterial family, 91 families were detected in the cloacal samples of wild young Magellanic penguins, however, only 26 with a relative abundance of  $\geq 1\%$  and accounted for over 79.9% in both groups of penguins (Figure 3). No differences were observed in the composition of family among all Magellanic penguins examined, being the families *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Gammaproteobacteria\_unclassified*, *Family\_XI*, *Weeksellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Moraxellaceae*, *Clostridiales\_unclassified*, *Sphingobacteriaceae* and *Shewanellaceae* the most abundant and conserved (Additional file 1).



**Figure 3.** Bar charts showing percentage of cloacal bacterial families in pooled samples of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins.

Within the 155 genera present in the six pooled-samples, 28 were the most abundant (accounted for over 67% of OTUs in both groups). The relative abundance of genera detected in the cloacae samples of Magellanic penguins are shown in Table 2. The genera *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Chryseobacterium*, unclassified Enterobacteriaceae, Gammaproteobacteria and Family\_XI were the most frequently detected in both groups of penguins. In spite of the fact that some genera have been detected in higher frequency among the groups, for example, *Fastidiosipila*, unclassified Clostridiales, Actinobacteria and Family\_XI, no statistical differences were observed between the groups ( $P > 0.05$ ).

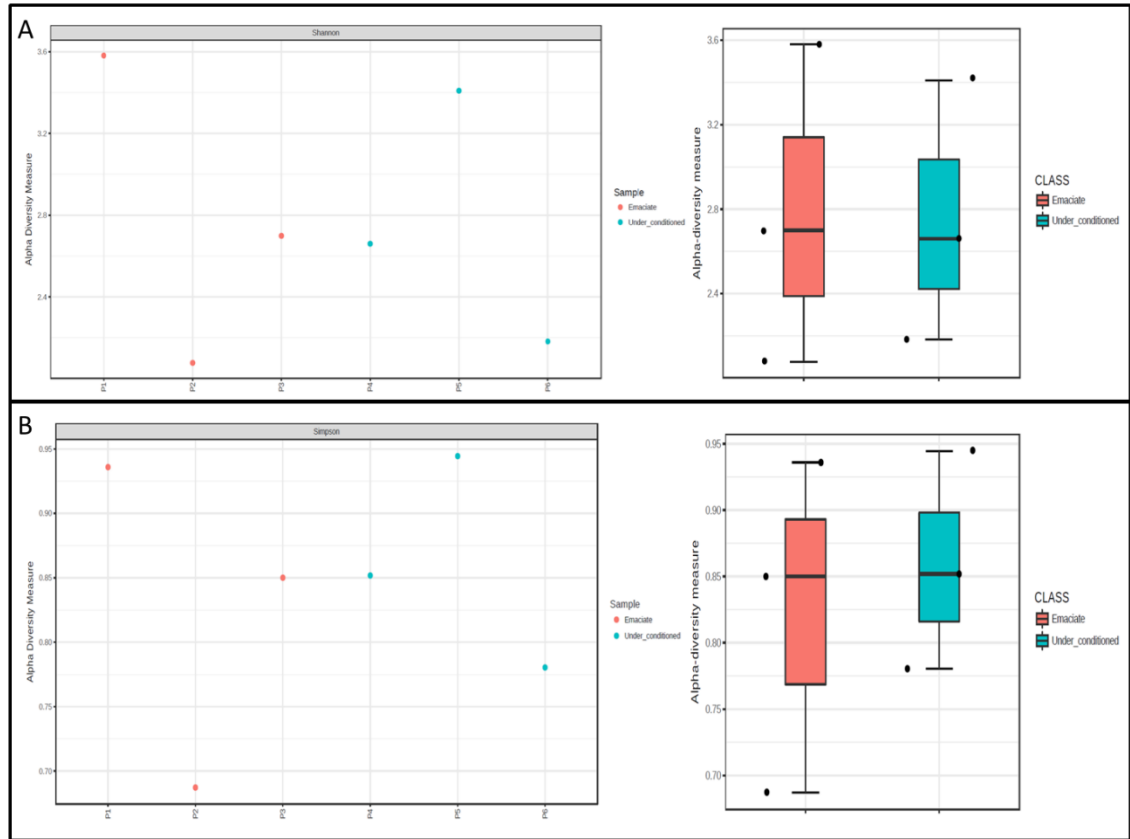
**Table 2.** Estimated Relative Abundance of genera identified in cloacal samples of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins.

Phyla	Genera	Mean of sequences abundance identified in		
		Emaciated	Under-conditioned	Media
Proteobacteria	Unclassified Enterobacteriaceae	8.1	8.5	<b>8.3</b>
	Unclassified Gammaproteobacteria	8.5	6.9	<b>7.7</b>
	<i>Pseudomonas</i>	6.3	4.8	<b>5.6</b>
	<i>Psychrobacter</i>	3.5	4.3	<b>3.9</b>
	<i>Shewanella</i>	2.7	2.2	<b>2.5</b>
	Unclassified Burkholderiaceae	1.6	2.7	<b>2.1</b>
	Unclassified Pseudomonadaceae	2.5	1.6	<b>2.1</b>
	Unclassified Rhodobacteraceae	1.6	1.3	<b>1.4</b>
	Unclassified Alteromonadales	1.1	1.2	<b>1.2</b>
	<i>Brevundimonas</i>	1.2	1.0	<b>1.1</b>
	<i>Janthinobacterium</i>	0.9	1.3	<b>1.1</b>
	Unclassified Cardiobacteriaceae	1.0	1.1	<b>1.0</b>
Firmicutes	Unclassified Family_XI	2.8	5.0	<b>3.9</b>
	Unclassified Clostridiales	2.6	4.7	<b>3.6</b>
	<i>Fastidiosipila</i>	1.7	2.7	<b>2.2</b>
	Unclassified Lachnospiraceae	0.8	1.5	<b>1.2</b>
	<i>Paenibacillus</i>	0.8	1.1	<b>1.0</b>
	<i>Ezakiella</i>	0.9	1.1	<b>1.0</b>
Actinobacteria	Unclassified Actinobacteria	1.6	2.8	<b>2.2</b>
	Unclassified Actinomycetaceae	1.1	1.2	<b>1.2</b>
	<i>Rhodococcus</i>	0.9	1.1	<b>1.0</b>
Bacteroidetes	Unclassified Dysgonomonadaceae	1.9	2.6	<b>2.3</b>
	<i>Chryseobacterium</i>	3.4	2.6	<b>3.0</b>
	Unclassified Weeksellaceae	1.9	1.7	<b>1.8</b>
	Unclassified Bacteroidales	1.1	1.6	<b>1.4</b>
	<i>Sphingobacterium</i>	1.8	0.6	<b>1.2</b>
	Unclassified Sphingobacteriaceae	0.8	1.4	<b>1.1</b>
Bacteria_unclassified	Unclassified Bacteria	1.3	1.7	<b>1.5</b>

There were no significant differences between the samples analyzed.

### Alpha and Beta Diversities

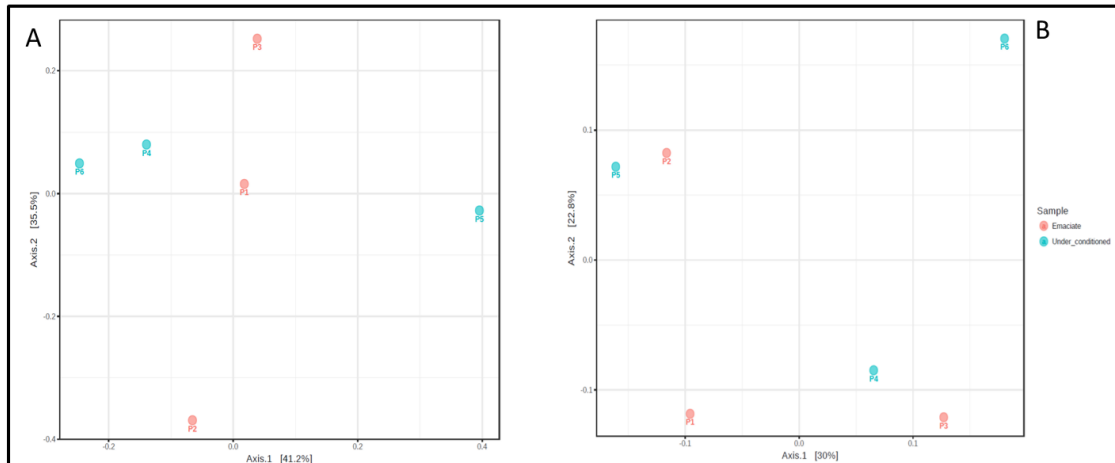
Alpha diversity indices in cloacal microbiota are shown in Figure 4. According to Shannon (2.65) and Simpson (0.85) indexes, no significant differences in the alpha diversities of the bacterial communities among emaciated and under-conditioned were observed.



**Figure 4.** Shannon's diversity and Simpson diversity indexes in cloacal bacteria community of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins. (A) Shannon's diversity, on the right alpha diversity (individual) and left boxplots; (B), Simpson diversity index, on the right alpha diversity (individual) and left boxplots. Error bars represent standard error (SE).

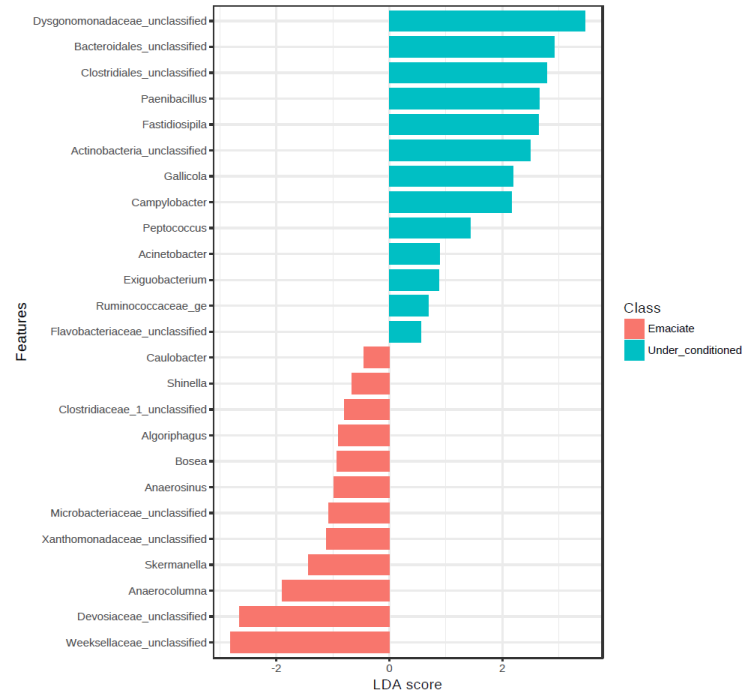
Beta diversity was calculated using two different metrics: weighted and non-weighted UniFrac distance metrics, since they can lead to different insights into the association among microbial communities as shown by other research groups [51, 52]. Principal coordinates analysis (PCoA) of the weighted and non-weighted UniFrac distances metric in cloacal microbial community of wild young Magellanic penguins, revealed that each pool has distinct microbial populations. The weighted UniFrac suggested an association between the microbial community in under-conditioned penguins P6 and P4, and a large distance between the microbial community of emaciated penguins P2 and under-condition penguins P5. On the other hand, non-weighted UniFrac showed a larger distance between the microbial community of emaciated penguins P1 and under-condition penguins P6 (Figure 5).





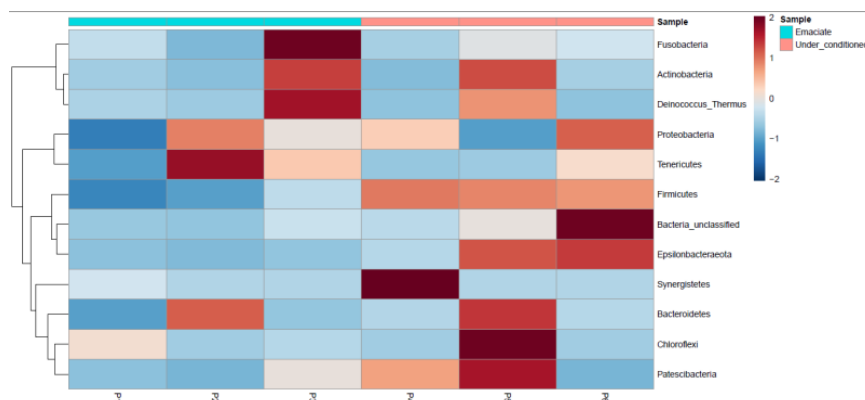
**Figure 5.** Principal coordinate analysis (PCoA) plots using weighted (A) and non-weighted (B) UniFrac distance metrics in cloacal bacteria community of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins. The plots were created using the UniFrac from QIIME.

Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was used to identify specific bacterial taxa differentially distributed between estimated and under-conditioned groups. The value of FDR 0.537 showed no significant difference between under-conditioned and estimated penguins. A total of 13 genera (*Paenibacillus*, *Fastidiosipila*, *Gallicola*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium* and six unclassified genera Dysgonomonadaceae, Bacteroidales, Clostridiales, Actinobacteria, Ruminococcaceae, Flavobacteriaceae) were differentially represented in under-conditioned penguins, and 12 genera (*Caulobacter*, *Shinella*, *Algoriphagus*, *Bosea*, *Anaerosinus*, *Skermanella*, *Anaerocolumna*, Clostridiaceae\_1, Microbacteriaceae, Xanthomonadaceae, Weeksellaceae, Devosiaceae) were differentially represented in emaciated penguins. In addition, *Skermanella*, *Anaerocolumna*, *Caulobacter*, *Shinella*, *Algoriphagus*, *Bosea*, *Anaerosinus* and unclassified Devosiaceae were observed only in emaciated group and *Xiguobacterium*, unclassified Ruminococcaceae and Flavobacteriaceae in under-conditioned penguins (Figure 6).



**Figure 6.** Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) of bacterial taxa in cloacal samples of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins.

The hierarchically clustered heat map was performed to identify connections among the samples. The relative abundance for each bacterial genus was depicted by color intensity within the labels indicated in the figure 7. The heat map was performed using phylum information. The frequency of distribution indicated high and low abundance distributions of microbial communities for each pool. The distribution of Firmicutes phylum was similar in P4, P5 and P6 samples (under-conditioned penguins).

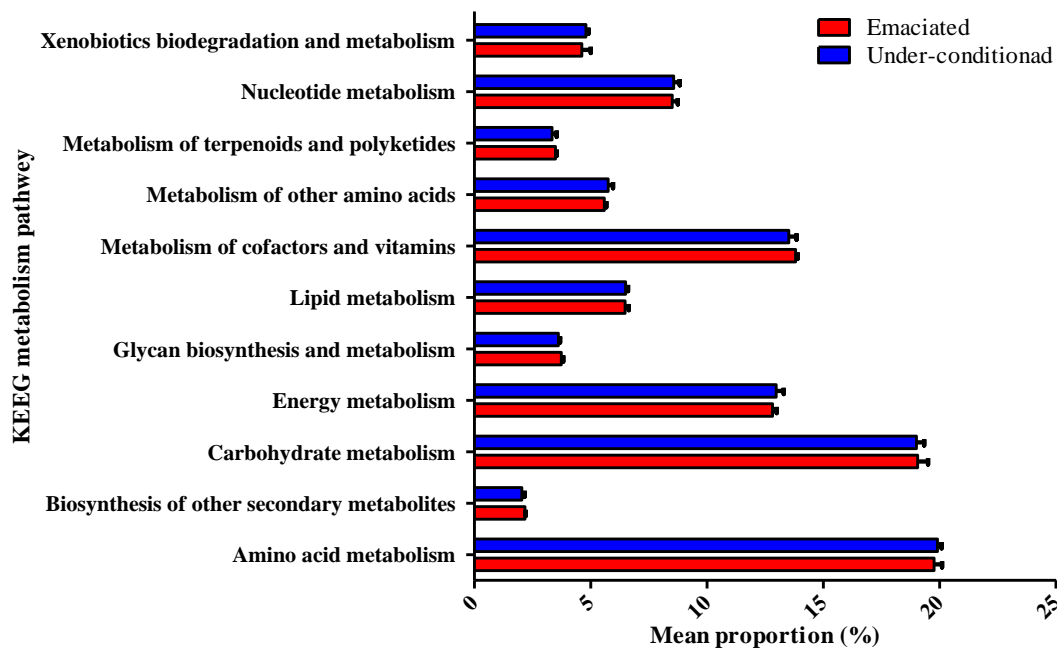


**Figure 7.** Hierarchically clustered heat map of the bacterial distribution of different Phyla in cloacal bacteria community of emaciated (P1 to P3) and under-conditioned (P4 to P6) wild young Magellanic penguins. Hierarchical dendrogram shows the bacterial distribution in each pool. The heat map plot depicts the relative percentage of each bacterial pool (variables).

clustering on the vertical-axis) within each phylum (horizon-axis). The relative values for bacterial phylum are indicated by color intensity within the label indicated at the side of the figure.

### Microbial function prediction based on 16S *rDNA* data

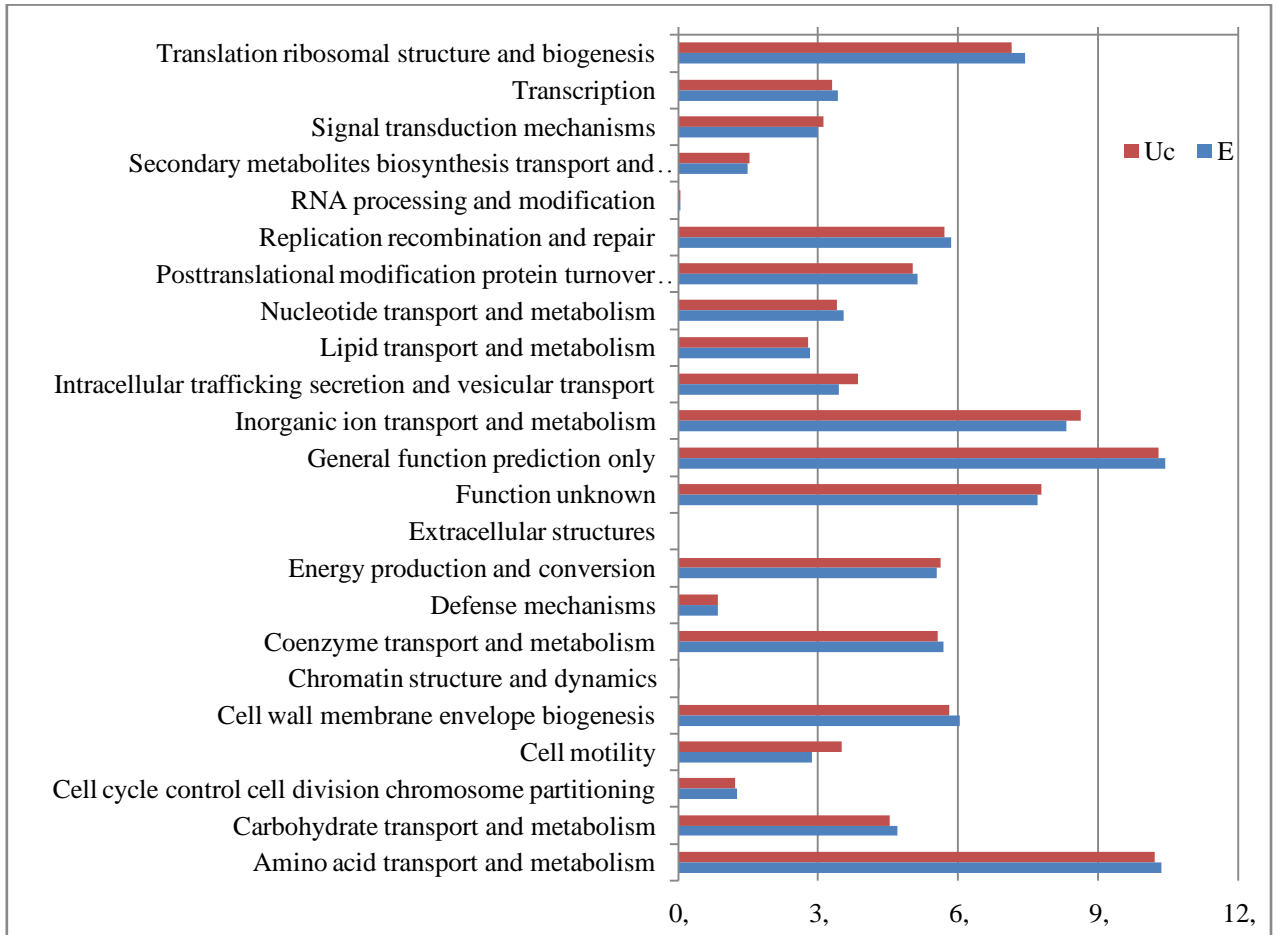
Functional predictions of the cloacal microbiota in wild young penguins were determined in both emaciated and under-conditioned groups by KEGG pathways [53] (Figure 6). Within the metabolism pathways, the most represented metabolic routes were amino acid biosynthesis (19.76% E and 19.90% Uc), carbohydrate metabolism (19.04% E and 18.99% Uc) metabolism of cofactors and vitamins (13.80% E and 13.50% Uc), energy metabolism (12.82% E and 12.97% Uc), nucleotide metabolism (8.50% E and 8.57% Uc), lipid metabolism (6.47% E and 6.49% Uc) and other amino acids (5.57% E and 5.75% Uc). None of the identified processes showed significant differences in the predicted abundance of metabolic routes between emaciated and under-conditioned penguins.



**Figure 8.** Predicted metabolic functions of the cloacal microbiota of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins.

To characterize differences in the functional community of cloacal microbiota, cluster of orthologous groups (COG) of protein categories was used. The transcripts with COG annotations were grouped into 23 functional categories. In both groups no significant differences were observed. The largest category was “General function prediction only”

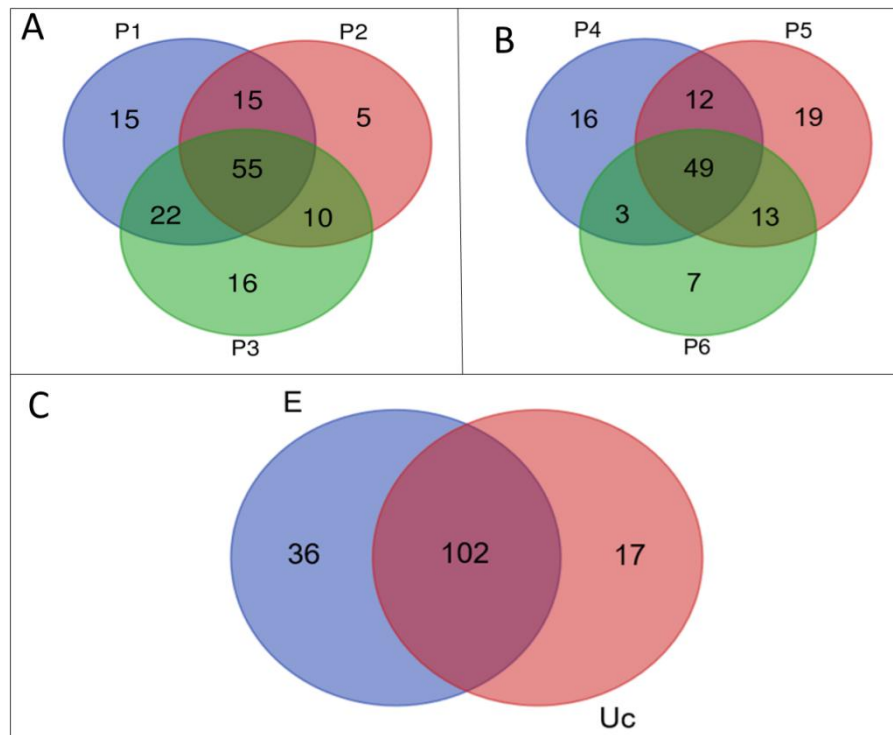
(mean between COG annotations 10.36%), following by amino acid transport and metabolism (10.29%), inorganic ion transport and metabolism (8.47%), function unknown (7.74%), and translation ribosomal structure and biogenesis (7.29%) (Figure 9).



**Figure 9.** Function classification in Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG). All transcripts were aligned to the COG database to predict possible functions. The proteins were functionally classified into 23 groups. COG categories were indicated in percentage.

### Core microbiota

Among the 155 OTUs identified in cloacal microbiota of emaciated and under-conditioned wild young Magellanic penguins, 102 OTUs were shared by both groups (65.80%), 33 OTUs (21.29%) belonged to Proteobacteria, 26 OTUs (16.77%) to Firmicutes, 17 OTUs (10.96%) to Actinobacteria, 17 OTUs (10.96%) to Bacteroidetes and 9 OTUs (5.80%) to other phyla. Moreover, 36 OTUs were observed only to emaciated group (23.22%) and 17 OTUs only in under-conditioned group (10.97%) (Figure 10).



**Figure 10.** The Venn diagram indicate the genera (OTUs) found in emaciated and under-conditioned groups. (A) Venn diagram shows the unique and shared OTUs in the emaciated (P1, P2 and P3) and (B) under-conditioned groups (P4, P5 and P6). (C) The numbers inside Venn diagram indicate unique and shared genera between groups emaciated (E) and under-conditioned (Uc).

## Discussion

The cloacal microbiota of the wild young Magellanic penguins with different body masses was investigated by high throughput sequencing. The results showed that microbial composition and function did not showed significant differences between emaciate and under-conditioning groups. Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Proteobacteria, and Actinobacteria phyla were detected into the cloacal microbiota of wild Magellanic penguins. These phyla have been previously reported on cloacal samples of other birds [54-58] (Table 3).

Variations in the gastrointestinal microbiota in penguins have been associated to the host, diet, age, habitat, sex and others factors [36-38]. In a study evaluating the interspecific variations of the gastrointestinal microbiota in four species of penguins differences in the overall abundance of phyla were observed. For example, Proteobacteria is one of the most abundant phyla in cloacal samples of Little Penguin (*E. minor*) [36]. Barbosa et al [38], evaluating the gut microbiota in Chinstrap Penguin (*Pygoscelis antarcticus*), detected 21 phyla, and most abundant were Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria and Tenericutes.

Here, a relative higher abundance of Proteobacteria was observed in the cloacal microbiota when compared to Firmicutes and Bacteroidetes phyla. The Proteobacteria, degrades a number of complex polysaccharides as energy source, and the predominance of this phyla could be attributed to the necessity of the penguins to store energy during the migratory period. According to Cottrell and Kirchman [57], Alpha, Beta and Gamma Proteobacteria in marine microbial communities have the ability to use organic matter such as chitin, proteins and amino acids. In addition, in some host species, high abundances of Proteobacteria have been associated with dysbiosis in hosts with metabolic or inflammatory disorders.

Both groups of penguins have a higher proportion of Proteobacteria in their gastrointestinal tract when compared with mammals or hens domestic [58]. The function of the Proteobacteria phylum remains undetermined, since there is a high diversity of taxa within this group. Some Proteobacteria can be functionally redundant with members of other bacterial groups and need to have their function better understood [59]. An important point to be observed in the present study is the absence of a well-conditioned or over-conditioned group, this is due to the fact that since we were working with wild animals and generally the penguins that arrive to the South coast are debilitated animals or dehydrated. In addition, these birds face the competition for food resources with commercial fishing, by catch and climate change [6,7,11,16,59]. From this context we can think of two hypotheses to explain the results: Normal Microbiota and Dysbiosis.

In Normal Microbiota hypothesis, the phylum Proteobacteria found in high frequencies in the evaluated samples could be important in the capture of energy, since this phylum was found in the intestines of species of neotropical frugivorous birds, with a dominance of 43% in upper and 57% in lower intestines [60]. High abundances of this phylum were also found in feces of two migratory shorebird species, such as Red Knot (*Calidris canutus*) (54.5%) and Ruddy Turnstone (*Arenaria interpres*) (45.3%). Dewar *et al.* [61] reports that members of the family Enterobacteriaceae (Proteobacteria) were associated with gut maturation and development, absorption of dietary fats and lipids, and soluble vitamins, enhance the immune system, alteration of lipoprotein profiles, modulation of proinflammatory and anti-inflammatory gene expression. On the other hand, these microbes were implicated in Gastro-intestinal pathologies, brain-gut axis, and neurological conditions [62-96].

In some host species, high abundances of Proteobacteria have been associated with dysbiosis in hosts with metabolic or inflammatory disorders [67]. According to Shing

[68], the increase in Proteobacteria abundance is linked to imbalance in the gut microbial community which may be a potential marker of disease risk in mammals. Dysbiosis occurs with the Proteobacteria boom, this occurs because the microorganisms belonging to Enterobacteriaceae have a high genetic variability and frequency of conjugated mediated gene transfer, giving these bacteria a greater aptitude on the other members belonging to the microbial community of the intestine [68, 69]. This increase of Proteobacteria is caused at the moment of interruption of host homeostasis by environmental factors, diet and inflammation [68]. One of these factors that could possibly break homeostasis is malnutrition; McGee and McMurray [70] have shown that protein malnutrition negatively influences immunity by lowering the total IgA concentration in the gut of rats. This deficiency of IgA in the intestine induces increased colonization by Protobacteria and greater susceptibility to intestinal diseases [71].

In the phylum Proteobacteria, the genus *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) was predominant. This genus was described in fecal samples of Bar-headed Goose (*Anser indicus*), Gentoo, Little and Macaroni penguins [61, 72,73]. *Pseudomonas* could be well-adapted to the penguins gut, optimizing the digestion of dietary and producing a vast array of secondary metabolites with antimicrobial activity against other bacteria, fungi and protozoa [61, 74-76].

Other genus that occurred at relatively high frequency in cloacal samples of Magalhaes penguins was *Psychrobacter* (Moraxellaceae). This genus showed the ability to degrade chitin, found within cephalopods - mollusks and crustaceans-, important part of a penguins diet. Chitin has also been identified in a wide variety of sources, including fish, krill, and ornithogenic soils of Antarctica [77]. In addition, this genus was observed in the intestinal microbiota of Little Penguins [61]. The genus *Psychrobacter* has probiotic properties, which can alter gut microbiota profiles favoring the growth of anaerobic bacteria. They are butyrate-producing bacterium and their presence in Little Penguin was positively associated with body mass and fledging survival [61]. However, further analysis would be necessary to confirm this hypothesis.

The presence of the *Shewanella* genus in the cloacal samples in this study could be related to the diet of the animals, since this bacterium was isolated from aquatic habitats, fish and mollusc both food source for the penguins [78-80]. In addition, this genus has the ability to degrade the chitin present in the exoskeletons of marine invertebrates such as shrimp, krill, crab and lobster [81, 82].

The phylum Firmicutes was the second most abundant observed in cloacal samples of wild young Magellanic penguins. This phylum is associated with the breakdown of complex carbohydrates, polysaccharides, sugars and fatty acids, which are then used by the host as an energy source [83, 84]. The relative abundance of the phylum Firmicutes observed in this study was similar with the results found in the Gentoo penguin (Table 3). These microorganisms were observed in stomach regurgitation, guano, and rookery soils from Adélie and Chinstrap penguins and in feces from King, Gentoo and Macaroni penguins [73, 85]. Still on this cutting edge, unclassified Family\_XI, Clostridiales and *Fastidiosipila* were identified in almost double the abundance in under-conditioned penguins when compared with emaciated. The presence of these microorganisms could be influencing a better body condition of this group because, since Clostridios are often associated with production of anti-inflammatory properties, generated by their fermentative metabolism of carbohydrates and amino acids that produce fatty acids (SCFA) beneficial acids, acetate, propionate and butyrate [86,87]. On the other hand, the taxonomic group Clostridial has also been known for some important pathogens that can release toxins and cause intestinal diseases such as *C. botulinum*, *C. perfringens* and *C. tetani* [88-93].

**Table 3.** Percentage of main phyla describe in difference species of wild young penguins

Espécies	Firmicutes	Bacteroidetes	Proteobacteria	Fusobacteria	Actinobacteria	Nº de animais
Adelie <sup>1</sup>	41	5	12.5		35	6
Chinstrap <sup>2</sup>	60	17.5	11	9	3.6	53
Gentoo <sup>3</sup>	18	7	18	55	1	4
King <sup>3</sup>	47	17	4	3		4
Little <sup>3</sup>	24	22	30	1	6	4
Macaroni <sup>3</sup>	43	18	30		3	4
Magalhães <sup>4</sup>	20	16.7	49.2	0.8	9.5	20

1- Banks *et al.* [37]. 2- Barbosa *et al.* [38]. 3- Dewar *et al.* [36]. 4- Present work.

Similar frequency of Bacteroidetes found in cloaca samples of Magalhães Penguin was observed in Macaroni, King and Chinstrap (Table 3). Bacteroidetes are knowed to degrade organic matter with high molecular weight, like proteins and carbohydrates. The genus *Chryseobacterium* (Flavobacteriaceae) identified in this study appears to be part of the



normal microbiome of penguins, since it was detected in the stomach, guano, rookery of the penguins of Adelie (*Pygoscelis adeliae*) and Chinstrap (*Pygoscelis antarctica*) and cloacal samples of Pygoscelis, King, Gentoo and Macaroni penguins [74,85]. However, *Chryseobacterium* is usually an opportunistic pathogen [73].

Another microorganism detected in the cloacal samples of wild young penguins was the unclassified Dysgonomonadaceae. The presence of this genus in the cloacal sample analyzed could be associated with the consumption of Arthropodes by penguins, since these bacteria make that part of the microbiota of the intestine of this invertebrate animal. According to Murakami *et al.* [94] Dysgonomonadaceae was found in elevated quantities in the intestine of the *Andiperla willinki* and possess the ability to degrade several polysaccharides ingested by host-derived foods such as algae.

The genus *Rhodococcus* and unclassified genera Actinobacteria, and Actinomycetes from Actinobacteria were identified in the cloacal samples. The phylum Actinobacteria would play an important role in the intestinal microbiota of the penguins, since this phylum is a chitin decomposer. The microorganisms belonging to this phylum can use chitin or chitosan as sources of carbon and nitrogen [95, 96]. The *Rhodococcus* genus has been described in guano deposits in Antarctica [97] and rookery soils from *Pygoscelis* penguins [83,97].

The Shannon and Simpson diversity showed no significant results in both groups, since the bacterial community varied widely between samples. Other researchers have found similar results. Dewar *et al.* [61] compared the microbiota of Little penguins and Short-tailed shearwaters (*Ardenna tenuirostris*) and also no differences in alpha diversity were observed. Regarding beta diversity, in this study, both metrics suggested that each sample studied harbored different microbial communities. However, the core of bacteria belonging to the two groups studied was 65.8% (Figure 9), that is, there were no differences between the both groups studied.

Interestingly, the metabolic profile of bacterial communities determined by KEGG (Figure 8) showed that the most prominent categories were the amino acid pathways (mean 19.83%), and carbohydrate (mean 19.01%), similarly in all samples. The results observed by Cluster of Orthologous Groups (COG) of protein categories, showed that the more predominant were general function prediction only, following by amino acid transport and metabolism and inorganic ion transport and metabolism. These results suggest that although penguins were separated into two groups by differences in their body masses, the emancipated and under-conditioned groups have similar environments (Figure 9).

In conclusion, choose between the two hypotheses of "Healthy Penguins" or "Dysbiosis" would be a hasty way to conclude this research, since studies on intestinal microbiota of penguins during their migration are scarce. Studies with other birds show that the microbiota may have great influence with the type of diet, since the phylum Proteobacteria was predominant. Several factors can influence the microbiota as age, habitat, host, sex, antropogenic and other factors. Finally, this research added important information about the microbial communities present in the cloacal of undernourished penguins during their migration, and maybe this is basic the gut microbiota found in the first year of penguin life and which could be valuable information in future comparisons with penguins of the same species. Therefore, the knowledge of the intestinal microbiota of penguins is a necessary first step for understanding the real condition of the animals. Our study provides background information that can be used in future studies to better understand the diversity and function of intestinal microbes in penguins and may aid further research on the intestinal microbiota in birds during their migration and body condition.

### **Acknowledgements**

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq - # 407886/2018-4, #300912/2012-9, #302421/2012-2 and #303251/2014-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazilian government that supported this work. We are grateful to the Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul and all staff from Center for Coastal Studies, Limnology and Marine (Ceclimar) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul to help in the data collection.

## References

1. Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP. Subtropical convergence environments: the coast and sea in the southwestern Atlantic. Springer, Berlin.1997; 82–85.
2. Borzone CA, Pezzuto PR, Marone E. Oceanographic characteristics of a multi-specific fishing ground of the Central South Brazil Bight. *Mar Ecol.* 1999; 20: 131–146.
3. Muehe D. O litoral brasileiro e sua compartimentação. In: Cunha SB, Guerra AJT (eds) *Geomorfologia do Brasil*, 2nd edn. Editora Bertrand Brasil, Rio de Janeiro. 2001; 273–349.
4. Cubas Z.S; Silva JCR; Catão-Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens*. 1st ed. São Paulo, Roca. 2007; 1354.
5. Franz I, Agne CE, Bencke GA, Bugoni L, Dias RA. Four decades after Belton: a review of records and evidences on the avifauna of Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* 2018; 108, e2018005.
6. Dantas GPM, Almeida VS, Maracini P, Serra SD, Chame M, Labarthe N, *et al.* Evidence for northward extension of the winter range of magellanic penguins along the brazilian coast. *Mar Ornith.* 2013; 41: 195–197.
7. Fonseca VSS, Petry MV, Jost AH. Diet of the Magellanic Penguin on the Coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Waterbirds.* 2001; .24,2: 290-293. doi.org/10.2307/1522046.
8. Pinto MBLC, Siciliano S, Di Benedetto APM. Stomach contents of the Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil. *Mar Ornith.* 2007; 35: 77-78.
9. Baldassin P, Santos RA, Cunha JMM, Werneck MR, Gallo H. Cephalopods in the diet of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*), Forster, 1781) found on the cost of Brazil. *Mar Ornith.* 2010; 38: 55-57.
10. Frere E, Gandini P, Lichtschein V. Variación latitudinal en la dieta del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en la costa Patagónica, Argentina. *Ornit Neotrop.* 1996; 7: 35–41.
11. Mäder A, Sander M, Casa GJR. Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim-de-magalhaes, *Spheniscus magellanicus* influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. *R Bras Ornit.* 2010; 18: 228–233.
12. Sick H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997; 862p.
13. Vooren CM and Brusque L F. *As aves do ambiente costeiro do Brasil: Biodiversidade e conservação*. Rio Grande: Pronabio. 1999.
14. Weigert SC, Klippel S, Madureira LSP, Vooren CM, Pinho MP, Ferreira CS. As águas da plataforma sul como ambiente físico. Porto Alegre: Igaré. 2005; 23-33.

15. Xavier MO, Soares MP, Meinerz ARM, Nobre MO, Osório LG, Silva-Filho RP, *et al.* Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. *Braz J Microb.* 2007; 38: 480-484.
16. Garcia-Borboroglu P, Boersma PD, Ruoppolo V, Reyes L, Rebstock GA, Griot, *et al.* Chronic oil pollution harms Magellanic Penguins in the Southwest Atlantic. *Mar Pollut.=* *Bullet.* 2006; 52: 193–198.
17. IUCN 2019. IUCN Red List of Threatened Species. Available from: <https://www.iucnredlist.org/>.
18. Martínez I. Family Spheniscidae (Penguins). In *Handbook of the Birds of the World*, (J. Del Hoyo, A. Elliott and J. Sargatal, Eds.). Lynx Ed. Barcelona. 1992; 1: 140-172.
19. Denuncio P, Mandiola MA, Salles SBP, Machado R, Ott PH Oliveira LR, Rodriguez D. Marine debris ingestion by the South American Fur Seal from the Southwest Atlantic Ocean. *Mar Pollut* *Bullet.* 2017; 15; 420-425.
20. Deng P, Swanson K. Gut microbiota of humans, dogs and cats: Current knowledge and future opportunities and challenges. *Brit J Nutr.* 2015; 113: 6-17. doi:10.1017/S0007114514002943.
21. Waite DW, Taylor MW. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Front Microbial.* 2015; 6: 673. doi:10.3389/fmicb.2015.00673.
22. Trinh P, Zaneveld JR, Safranek S, Rabinowitz PM. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. *Front Publ Health.* 2018; 6: 235. doi:10.3389/fpubh.2018.00235.
23. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastro.* 2012; 9: 577–89.
24. Hand D, Wallis C, Colyer A, Penn CW. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *PLOS One.* 2013; 8: 53115.
25. Nelson TM, Rogers TL, Carlini AR, Brown MV. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Env Micro.* 2013; 15: 1132–1145.
26. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *P Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 15718–15723.
27. Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, Mackie RI. Molecular ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2004; 5: 31–48.
28. Zaneveld J, Turnbaugh PJ, Lozupone C, Ley RE, Hamady M, Gordon JI, *et al.* Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12: 109–114.
29. Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut.* 2010; 59:1589–1590.

30. Dewar ML, Arnould JPY, Krause L, Dann P, Smith SC. Interspecific variations in the faecal microbiota of Procellariiform seabirds FEMS Microbiol Ecol. 2014; 89: 47–55.
31. Nelson T. Factors influencing the gut microbiota of Antarctic seals. [Ph. D. Thesis], University of New South Wales, Sydney, Australia. 2012. Available from: <http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:10595/SOURCE02?view=true>.
32. Medeiros AW, Giongo A, Valdez FP, Amorin DB, Tavares M, d’Azevedo PA, et al. Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). FEMS Microbiol Ecol. 2016; 92: 029.
33. Lauer-Júnior CM, Medeiros AW, Giongo A, dos Anjos Borges LG, de Amorin DB, Tavares M, et al. Fecal Eukaryotic Community of Wild Young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic Fur Seals (*Arctocephalus tropicalis*). Ann Mar Biol Res. 2017; 4(2): 1025.
34. Liao F, Liang J, Fu X, Xu W, Duan R, Wang X, et al. Characteristics of microbial communities and intestinal pathogenic bacteria for migrated *Larus ridibundus* in southwest China. Microb open. 2018; Jul 5: 1-9. doi.org/10.1002/mbo3.693.
35. Dewar ML, Arnould JP, Krause L, Dann P, Smith SC. Interspecific variations in the faecal microbiota of *Procellariiform* seabirds. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 89; 47–55. doi: 10.1111/1574-6941.12332.
36. Dewar ML, Arnould JPY, Dann P, Trathan P, Groscolas R, Smith S. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. Microb open. 2013; 2: 195–204. doi: 10.1002/mbo3.66 PMID: 23349094.
37. Banks JC, Cary SC, Hogg ID. The phylogeography of Adélie penguin faecal flora. Environ Microbiol. 2009; 11: 577–588. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01816.x PMID: 19040454.
38. Barbosa A, Balagué V, Valera F, Martínez A, Benzal J, Motas M, et al. Age-Related Differences in the Gastrointestinal Microbiota of Chinstrap Penguins (*Pygoscelis antarctica*). PLoS ONE. 2016; 11(4): e0153215. doi:10.1371/journal.pone.0153215.
39. Geraci J, Lounsbury V. Marine mammals ashore: a field guide for strandings. Baltimore: National Aquarium in Baltimore. Press 2005.
40. Clements J, Sanchez JN. Creation and validation of a novel body condition scoring method for the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) in the zoo setting. Zoo Biol. 2015; Nov; 34 (6): 538-46. doi: 10.1002/zoo.21241.
41. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci. USA. 2011; Mar 15;108 Suppl 1: 4516-22. doi: 10.1073/pnas.1000080107.
42. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software

- for describing and comparing microbial communities. *Appl Env Microbiol.* 2009; 75:7537–7541.
43. Rampelotto PH, Barboza ADM, Pereira AB, Triplett EW, Schaefer CE, de Oliveira Camargo FA et al. Distribution and interaction patterns of bacterial communities in an ornithogenic soil of Seymour Island, Antarctica. *Micr. Ecol.* 2015; 69(3): 684–694.
  44. Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Env Microbiol.* 2010; 12(7): 1889–1898.
  45. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016; 4: e2584.
  46. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acid Res.* 2013; 41(D1): 590-596.
  47. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Meth.* 2013; 10(12): 1200–1202.
  48. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Meth.* 2010; 7: 335–336.
  49. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Geno Biol.* 2011; 12(6): R60.
  50. Iwai S, Weinmaier T, Schmidt BL, Albertson DG, Poloso NJ, Dabbagh K, et al. Piphillin: improved prediction of metagenomic content by direct inference from human microbiome. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0166104.
  51. Garcia-Mazcorro JF, Castillo-Carranza SA, Guard B, Gomez-Vazquez JP, Dowd SE, Brighthsmith DJ. Comprehensive Molecular Characterization of Bacterial Communities in Feces of Pet Birds Using 16S Marker Sequencing. *Microb Ecol.* 2017; 73:224±235. doi.org/10.1007/s00248-016-0840-7 PMID: 27568186.
  52. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 1576–1585. doi:10.1128/AEM.01996-06.
  53. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucl Acid Res.* 2000; 28(1): 27–30.
  54. Waite DW and Taylor MW. Characterizing the avian gut microbiota: Membership, driving influences, and potential function. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2014.00223
  55. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, et al. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014; 360, 100–112. doi: 10.1111/1574-6968.12608.

56. Hird SM. Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Front. Microbiol.* 2017; 8:725. doi: 10.3389/fmicb.2017.00725.
57. Cottrell MT, Kirchman DL. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1692–1697. doi: 10.1128/AEM.66.4.1692-1697.2000.
58. Grond K, Sandercock BK, Jumpponen A, Zeglin LH. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *J A Biol.* 2018; e01788: 1-19. doi.org/10.1111/jav.01788.
59. Boersma PD. Penguins as marine sentinels. *BioScience.* 2008; v. 58, 7: 597-607.
60. Garcia-Amado MA, Shin H, Sanz V, Lentino M, Martínez LM, Contreras M, et al. Comparison of gizzard and intestinal microbiota of wild neotropical birds. *PLoS ONE.* 2018; 13(3): e0194857. doi.org/10.1371/journal.pone.0194857.
61. Dewar ML, Arnould JPY, Allnutt TR, Crowley T, Krause L, Reynolds J, et al. Microbiota of little penguins and short-tailed shearwaters during development. *PLoS ONE.* 2017; 12(8): e0183117. doi.org/10.1371/journal.pone.0183117.
62. Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AAM. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogast Motil.* 2009; 21(12): 1239-49. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x PMID: 19650771.
63. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lip Res.* 2006; 47(2): 241-59. doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200 PMID: 16299351.
64. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Berge M, Cenac C, et al. Metabolic adaptation to a high fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut.* 2012; 61: 543-53. doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301012 PMID: 22110050
65. Swann JR, Want EJ, Geier FM, Spagou K, Wilson ID, Sidaway JE, et al. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments *PNAS.* 2011; 108 (1): 4523-30.
66. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroent.* 2011; 141(2): 599-609. doi: 10.1053/j.gastro.04.052 PMID: 21683077.
67. Fowler ME, Cubas ZS. *Biology, Medicine, and Surgery of South American wild animals.* Wiley. 2001; 60.
68. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015; 33: 496–503 doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011 PMID: 26210164.
69. Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard DJ. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2012; 109: 1269–1274.

70. McGee DW and McMurray DN. The effect of protein malnutrition on the IgA immune response in mice. *Immunol.* 1988; Jan; 63 (1): 25–29. PMC1454697.
71. Mirpuri J, Raetz M, Sturge CR, Wilhelm CL, Benson A, Savani RC, et al. *Gut Microbes.* 2014; Jan 1; 5(1): 28–39. doi: 10.4161/gmic.26489.
72. Wang W, Cao J, Yang F, Wang X, Zheng S, Sharshov K, et al. High- throughput sequencing reveals the core gut microbiome of Bar- headed goose (*Anser indicus*) in different wintering areas in Tibet. *Microbiol open.* 2016; Apr; 5(2): 287–295. doi:10.1002/mbo3.327.
73. Dewar M. Gastrointestinal Microbiota of Seabirds. Thesis. Deakin University. 2012. Available from: <https://dro.deakin.edu.au/eserv/DU:30056597/dewar-gastrointestinal-2012A.pdf>.
74. Ghequire MG, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev.* 2014; 38: 523–568.
75. Giri SS, Sukumaran V, Sen SS, Jena PK. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. *Aquacult Nutr.* 2014; 20: 163–171. doi:10.1111/anu.12062.
76. Ramírez C and Romero J. Fine Flounder (*Paralichthys adspersus*) Microbiome Showed Important Differences between Wild and Reared Specimens. *Front Microbiol.* 2017; 8: 271. doi: 10.3389/fmicb.2017.00271.
77. Bozal N, Montes MJ, Tudela E, Guinea J. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53: 1093– 1100.
78. Canion A, Prakash O, Green SJ, Jahnke L, Kuypers MM, Kostka JE. Isolation and physiological characterization of psychrophilic denitrifying bacteria from permanently cold Arctic fjord sediments (Svalbard, Norway) *Environ Microbiol.* 2013; May; 15 (5):1606-18. doi: 10.1111/1462-2920.12110. Epub 2013 Mar 26.
79. Navarrete P, Espejo RT, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Microbial Ecol.* 2009; 57:550–561. doi: 10.1007/s00248-008-9448-x.
80. Kim D, Baik K, Kim MS, Jung BM, Shin TS, Chung GH et al. *Shewanella haliotis* sp. Nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57:2926–2931. doi: 10.1099/ij.s.0.65257-0.
81. Li M, Yang H, Gu JD. Phylogenetic diversity and axial distribution of microbes in the intestinal tract of the polychaete *Neanthes glandicincta*. *Microbial Ecol.* 2009; 58:892– 902. doi: 10.1007/s00248-009-9550-8.
82. Li SW, Zeng RJ, Sheng GP. An excellent anaerobic respiration mode for chitin degradation by *Shewanella oneidensis* MR-1 in microbial fuel cells. *J Bioch Eng.* 2017; 118:15, 20-24.



83. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:121–131.
84. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 2009; 11: 2574–2584.
85. Yew WC, Pearce DA, Dunn MJ, Adlard S, Alias SA, Samah AA, et al. Links between bacteria derived from penguin guts and deposited guano and the surrounding soil microbiota. *Polar Biol.* 2018; 41: 269. doi.org/10.1007/s00300-017-2189-x.
86. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Scien.* 2013; 341: 569–573. doi: 10.1126/science.1241165.
87. Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014; 111: 13145–13150. doi: 10.1073/pnas.1412008111.
88. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012; 148(6): 1258–70. doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035.
89. Falsen E, Collins MD, Welinder-Olsson C, Song Y, Finegold SM, Lawson PA. *Fastidiosipila sanguinis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, coccus-shaped organism from human blood. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005; 55 (2): 853-858.
90. Willyard C. Microbiome: gut reaction. *Nat.* 2011; 479 (7374): 5–7.
91. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, Tonelli A, Khalife WT, Schmidt TM, et al. Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea. *J Infect Dis.* 2008; 197(3): 435–8. doi:10.1086/525047.
92. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Scie.* 2008; 320(5883): 1647–51. doi:10.1126/science.1155725.
93. Ma B, McComb E, Gajer P, Yang H, Humphrys M, Okogbule-Wonodi AC, et al. Microbial Biomarkers of Intestinal Barrier Maturation in Preterm Infants. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2755. doi: 10.3389/fmicb.2018.02755.
94. Murakami T, Segawa T, Takeuchi N, Barcaza Sepúlveda G, Labarca P, Kohshima S, et al. Metagenomic analyses highlight the symbiotic association between the glacier stonefly *Andiperla willinki* and its bacterial gut community. *Environ Microbiol.* 2018; Nov. 20 (11): 4170-4183. doi: 10.1111/1462-2920.14420.
95. Beier S, Bertilsson S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Front Microbiol.* 2013; 4: 149. 1-12.
96. Lacombe-Harvey MÈ, Brzezinski R, Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018; 102: 7219. doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4.

97. Xiao X, Yin X, Lin J, Sun L, You Z, Wang P, et al. Chitinase genes in lake sediments of Ardley Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 7904–7909.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

O habitat intestinal de um organismo pode conter de 300 a 500 espécies diferentes de bactérias (BORRIELLO, 1986; GUARNER; MALAGELADA, 2003). Essas populações bacterianas, em conjunto com outros microrganismos presentes na microbiota TGI como os vírus, bacteriófagos, fungos e protozoários podem trazer contribuições funcionais aos seus hospedeiros (XIMENEZ; TORRES, 2017). A microbiota intestinal executa uma gama de funções importantes ao hospedeiro, como as ligadas ao sistema imunológico, nutrição, ganho de peso, entre outros (BACHMANN *et al.*, 2017).

A expertise na identificação de grandes grupos de microrganismos presentes nos mais diversos ambientes passou a se desenvolver mais rapidamente. Após o ano de 2004, com o desenvolvimento do sequenciamento de alto desempenho, pois esta técnica proporcionou um aumento significativo na rapidez do sequenciamento de DNA, aliada a redução de custos e a uma ampliação expressiva na quantidade dos dados gerados (REUTER *et al.*, 2015). Dessa forma, o número de trabalhos investigando a microbiota do TGI também cresceu. Entretanto, quando comparamos o número de pesquisas que avaliaram a microbiota do TGI de humanos com animais selvagens, nota-se que apenas uma pequena parcela destes estudos, até o presente momento, investigava amostras provenientes de animais selvagens. Este baixo número de trabalhos, possivelmente se deve à dificuldade de capturar e coletar amostras de animais selvagens, em especial os marinhos (BANKS *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2014; WELDON *et al.* 2015 MEDEIROS *et al.*, 2016 LAUER-JÚNIOR *et al.*, 2017).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a microbiota intestinal de animais marinhos selvagens, a principal finalidade deste trabalho foi caracterizar a microbiota intestinal eucariótica dos lobos-marinhos *A. australis* e *A. tropicalis*, e também a microbiota bacteriana da cloaca do pinguim-de-Magalhaes *S. magellanicus*.

Os resultados do estudo do Capítulo 1 sobre a microbiota de lobos-marinho jovens mostrou que a comunidade eucariótica fecal era dominada pelo filo Chordata, e representada por uma alta abundância da classe Mammalia. A maior frequência observada desta classe era esperada, uma vez que no DNA total extraído das fezes dos animais contém células dos próprios animais. Além disso, observou-se uma

grande variação nas frequências encontradas entre os animais, variando de 81,42% para a amostra proveniente do animal G1535 e 2,26% para o animal G1537. Estes resultados podem estar relacionados ao tipo de morte que foi determinada para os animais. Uma vez que os animais que apresentaram a maior abundância da classe Mammalia em suas amostras morreram de múltiplas fraturas ou de fratura cervical. Assim, estas lesões poderiam gerar hemorragias internas, aumentando a quantidade de células de mamíferos no sistema digestório dos animais. Deste modo, também pode ser explicada a menor frequência da classe mammalia observada nas amostras de fezes do animal G1537 que foi a óbito por morte natural.

A classe Chromadorea foi à segunda classe mais abundante e também identificada em todas as amostras analisadas. Porém, os resultados mostraram que o indivíduo G1516 teve a maior frequência observada como 43% e a menor de 3,2% observada na amostra G1517. A presença desta classe pode estar relacionada aos parasitas do gênero *Strongyloides* nestes animais. Estes parasitas já foram relatados no intestino delgado de *A. australis* (MENAFRA *et al.*, 2006). Além disso, este parasita também foi encontrado no intestino de filhotes de lobo-marinho nas colônias do Uruguai (KATZ *et al.* 2012).

A presença dos parasitas da classe Trematoda em pinípedes foi relatada pela presença da subclasse Digenea no intestino de leões marinhos sul-americanos encontrados mortos ao longo da costa do Rio Grande do Sul. Estes parasitas infectam os leões marinhos provavelmente por meio da alimentação destes mamíferos, pois esses animais são predadores de peixes conhecidos como salmonetes (*Mugil Platanus*), que comumente mantêm a presença de metacercarias (PEREIRA, 2013). Deste modo, a elevada abundância da classe Trematoda encontrada nas fezes do lobo marinho G1537, poderia estar associado a uma grande infecção causada por estes parasitas e que possivelmente deixou o animal debilitado e levando-o ao óbito.

É interessante ressaltar que outros grupos de eucariotos foram encontrados nas amostras dos lobos marinhos como Arthropoda e Mollusca, porém com frequências menores. Isso significa que, se por um lado a classe Mammalia era a mais abundante, por outro os lobos marinhos revelaram uma elevada presença de parasitas no intestino.

Os resultados do capítulo 2 descreveram a composição bacteriana presente na cloaca do pinguim-de-magalhães durante sua migração. A composição

microbiana foi dominada pelo filo Proteobacteria. Os índices sobre a composição e diversidade bacteriana de ambos os grupos não mostraram diferenças significativas. Os índices de Shannon e Simpson variaram entre os pinguins sub-condicionados e caquéticos em uma faixa relativamente pequena, sugerindo que não há grandes diferenças na diversidade bacteriana entre as diferentes massas corpóreas entre os dois grupos de pinguins.

As vias metabólicas mais representativas foram a biossíntese de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, metabolismo de cofatores e vitaminas em ambos os grupos.

Surpreendentemente, os resultados também mostraram amplas diferenças na composição da comunidade bacteriana quando foi comparada a microbiota do pinguim de Magalhães com outras seis espécies de pinguins. Segundo Barbosa e colaboradores (2016), estas diferenças poderiam estar associadas a dieta dessas espécies, por exemplo, o pinguim-gentoo têm uma porcentagem maior de peixes em sua dieta que as outras espécies de pinguins.

No estudo sobre a microbiota da cloaca dos pinguins de Magalhães foi observada uma quantidade representativa de microrganismos com a capacidade de degradar quitina. A principal diferença entre peixes e krill parece ser o exoesqueleto de quitina do krill. Segundo Beier e Bertilsson (2013) a quitina é degradada principalmente pelo filo Bacteroidetes em ambientes aquáticos e pelo filo Actinobacteria em ambientes como o de solo.

Uma dieta rica em quitina, como a dos pinguins deve favorecer a dominância de microrganismos degradadores de quitina. Para confirmar a importância bacteriana na decomposição quitina presentes no TGI de pinguins-de-magalhães, serão necessárias mais pesquisas visando caracterizar a real habilidade destas comunidades bacterianas em degradar a quitina.

Por fim, compreender a composição da microbiota intestinal poderia proporcionar mais informações sobre o modo de vida dos hospedeiros, a alimentação, os parasitas presentes e períodos com restrição de alimentos ou durante o período migratório destas aves.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo caracterizou diferentes e complexas comunidades de organismos eucarióticos habitantes do intestino de lobos-marinhos do gênero *Arctocephalus*, quanto os procarióticos na espécie de pinguim-de-magalhães selvagens. Além disso, este estudo forneceu o primeiro relato sobre a comunidade bacteriana presente em pinguins de Magalhães durante o período migração. Os dados gerados nesta pesquisa poderiam ser usados como para futuros trabalhos de comparação sobre a microbiota eucariótica e procariótica em animais selvagens durante a migração.

## REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, Washington, DC, v. 6, n. 237, p. 237ra65, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- ABSALONSEN, L.; TOLDO JÚNIOR, E. E. T. A influência da inflexão costeira na variabilidade da linha de praia em Mostardas, RS. **Pesquisas em Geociências**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 3-18, 2007. DOI: <https://doi.org/10.22456/1807-9806.19457>
- AINLEY, D. et al. Antarctic penguin response to habitat change as Earth's troposphere reaches 2°C above preindustrial levels. **Ecological Monographs**, Durham, v. 80, n. 1, p. 49-66, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1890/08-2289.1>
- AMBARDAR, S. et al. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 56, n. 4, p. 394-404, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0606-4>
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, Champaign Il, v. 83, n. 7, p. 1093-1098, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1093>
- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A. Microbes of the chicken gastrointestinal tract. In: PERRY, G. C. (Ed.). **Avian function in health and disease**. Bristol: CAB International, 2005. p. 124-127.
- ARDISSONE, A. N.; DE LA CRUZ, D. M.; DAVIS-RICHARDSON, A. G. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e90784, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090784>
- ARNOULD, J. P. Y.; HINDELL, M. A. Milk consumption, body composition and pre weaning growth rates of Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) pups. **Journal of Zoology**, London, v. 256, n. 3, p. 351-359, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0952836902000389>
- ARNOULD, J. P. Y.; HINDELL, M. A. The composition of Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) milk throughout lactation. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 605-612, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1086/316702>
- ARRIETA, M. C. et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Science Translational Medicine**, Washington, DC, v. 7, n. 307, p. 307ra152, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>
- BACHMANN, R. et al. Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery. **Gut**, London, v. 66, n. 4, p. 738-749, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312569>

- BALDASSIN, P. et al. Cephalopods in the diet of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*, Forster, 1781) found on the coast of Brazil. **Marine Ornithology**, Rondebosch, v. 38, p. 55-57, 2010.
- BALDASSIN, P. et al. Persistent organic pollutants in juvenile Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in South America. **Chemosphere**, Oxford, v. 149, p. 391-399, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.016>
- BANKS, J. C.; CARY, S. C.; HOGG, I. D. Isolated faecal bacterial communities found for Weddell seals, *Leptonychotes weddellii*, at White Island, McMurdo Sound, Antarctica. **Polar Biology**, Berlin, v. 37, n. 12, p. 1857-1864, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1567-x>
- BANKS, J. C.; CARY, S. C.; HOGG, I. D. The phylogeography of Adélie penguin faecal flora. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 577-588, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01816.x>
- BARBOSA, A. et al. Age-Related Differences in the Gastrointestinal Microbiota of Chinstrap Penguins (*Pygoscelis antarctica*). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. e0153215, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153215>
- BARBOSA, A. et al. Southernmost record of the Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* in Antarctica. **Marine Ornithology**, Rondebosch, v. 35, p. 281-282, 2007.
- BARLOW, G. M.; YU, A.; MATHUR, R. Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus. **Nutrition in Clinical Practice**, Baltimore, v. 30, n. 6, p. 787-797, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/0884533615609896>
- BEAUPLET, G. et al. Foraging ecology of subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) breeding on Amsterdam Island: Seasonal changes in relation to maternal characteristics and pup growth. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, n. 273, p. 211-225, 2004. DOI: <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v273/p211-225/>
- BEIER, S.; BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 149, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>
- BELLINI, C.; SANCHES, T.M.; FORMIA, A. Hawksbill Turtle Tagged in Brazil Captured in Gabon, Africa. **Marine Turtle Newsletter**, Woods Hole, v. 87, p. 11-12, 2000.
- BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul**: distribuição e biologia. São Leopoldo: Unisinos, 2000.
- BENTLEY, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, London, v. 456, n. 7218, p. 53-59, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07517>



BERTÊ, J.; MOREIRA, K.; PACHECO, L. Deixe-os na Praia. **Mundo Natureza**, Porto Alegre, p. 1-6, 2012.

BESTER, M. N. et al. Population trend of subantarctic fur seals at Gough Island. **African Journal of Wildlife Research**, Bloubergstrand, v. 36, n. 2, p. 191-194, 2006.

BESTER, M. N. Reproduction in the female subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*. **Marine Mammal Science**, Fort Wayne, v. 11, n. 3, p. 362-375, 1995. DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-7692.1995.tb00291.x>

BESTER, M. N. Subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*, at Gough Island (Tristan da Cunha Group). In: CROXALL, J. P.; GENTRY, R. L. (Ed.). **Status, biology and ecology of fur seals**. Washington, DC: NOAA, 1987. p. 57-60.

BIBBÒ, S. et al. Role of Microbiota and Innate Immunity in Recurrent *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2014, id. 462740, p. 1-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/462740>

BISGAARD, H. et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 128, n. 3, p. 646-652.e1-5, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.060>

BOERSMA, P. D. et al. Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). In: GARCIA, B. P.; BOERSMA, P. D. (Ed). **Penguins: natural history and conservation**. Seattle: University of Washington Press, 2013. p. 233-263.

BOERSMA, P. D. et al. Pinguino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*). In: GARCIA, B. P.; BOERSMA, P. D. (Ed). **Pinguinos: Historia Natural y Conservacion**. Buenos Aires: Vazquez Mazzini Editores, 2015. p. 233-263.

BOERSMA, P. D.; REBSTOCK, G. A. Climate change increases reproductive failure in magellanic penguins. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e85602, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085602>

BORGHI, E. et al. Antenatal Microbial Colonization of Mammalian Gut. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, 11 Oct 2018 [Epub ahead of print]. DOI: <https://doi.org/10.1177/1933719118804411>

BORRIELLO, S. P. Microbial flora of the gastrointestinal tract. In: HILL, M. J. (Ed.). **Microbial metabolism in the digestive tract**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 2-16.

BRANDÃO, M.; BRAGA, K.; LUQUE, J. L. Marine debris ingestion by magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 62, n. 10, p. 2246-2249, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.07.016>

BRUGMAN, S. et al. Mucosal immune development in early life: setting the stage. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v. 63, n. 4, p. 251-268, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0329-y>

BUNYAVANICH, S. et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 138, n. 4, p. 1122-1130, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.041>

CENTRO DE ESTUDOS COSTEIROS, LIMNOLÓGICOS E MARINHOS (CECLIMAR). Fauna marinha e costeira. [2019]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira>. Acesso em: 16 fev. 2019.

CLAESSON, M. J. et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, London, v. 488, n. 7410, p. 178-184, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11319>

COLOE, P. J.; BAGUST, T. J.; IRELAND, L. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. **The Journal of Hygiene**, London, v. 92, n. 1, p. 79-87, 1984.

CRESPO, E. A. et al. Status, population trend and genetic structure of South American fur seals, *Arctocephalus australis*, in southwestern Atlantic waters. **Marine Mammal Science**, Fort Wayne, v. 31, p. 866-890, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/mms.12199>

CUI, B. et al. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: safety, feasibility, and efficacy trial results. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 30, n. 1, p. 51-58, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.12727>

DAS, U. N. Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. **Nutrition**, Burbank, v. 18, n. 9, p. 786, 2002.

DENUNCIO, P. et al. Marine debris ingestion by the South American Fur Seal from the Southwest Atlantic Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 122, n. 1-2, p. 420-425, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.013>

DEWAR, M. L. et al. Interspecific variations in the faecal microbiota of Procellariiform seabirds. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 47-55, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12332>

DEWAR, M. L. et al. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. **Microbiologyopen**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 195-204, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.66>

DEWAR, M. L. et al. Microbiota of little penguins and short-tailed shearwaters during development. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 8, p. e0183117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183117>

DIAZ, R. J.; SOLAN, M.; VALENTE, R. M. A review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality. **Journal of Environmental Management**, London, v. 73, n. 3, p. 165-181, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.06.004>

DREHMER, C. J. **Variação geográfica em *Otaria byronia* (de Blainville, 1820) (Pinnipedia, Otariidae) com base na morfometria sincraniana**. 2005. 202 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, New York, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>

FAIR, P. A. et al. Associations between perfluoroalkyl compounds and immune and clinical chemistry parameters in highly exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 32, n. 4, p. 736-746, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.2122>

FERREIRA, C. M. et al. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2014, id. 689492, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/689492>

FERREIRA, J. M. et al. Multiple origins of vagrant subantarctic fur seals: A long journey to the Brazilian coast detected by molecular markers. **Polar Biology**, Berlin, v. 31, n. 3, p. 303-308, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0358-z>

FLINT, H. J. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews: Microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 121-131, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>

FONSECA, V. S. S.; PETRY, M. V.; JOST, A. H. Diet of the Magellanic Penguin on the Coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Waterbirds**, De Leon Springs, v. 24, n. 2, p. 290-293, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2307/1522046>

FRANZ, I. et al. Four decades after Belton: a review of records and evidences on the avifauna of Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 108, p. 1-38, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4766e2018005>

FRERE, E.; GANDINI, P.; BOERSMA, P. D. Aspectos particulares de la biología de reproducción y tendencia poblacional del Pingüino de Magallanes *Spheniscus magellanicus* em la Colonia de Cabo Virgenes, Santa Cruz, Argentina. **El Hornero**, Buenos Aires, v. 14, p. 50-59, 1996.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER (FEPAM). Programas e projetos. [2019]. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/programas/gerco.asp>. Acesso em: 16 fev. 2019.

GABRIEL, I. et al. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 62, n. 3, p. 499-511, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933906001115>

GAJARDO, K. et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x>

GARCÍA-BORBOROGLU, P. et al. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.006>

GERACI, J. R.; LOUNSBURY, V. J. **Marine mammals ashore**: a field guide for strandings. Baltimore: National Aquarium in Baltimore, 2005.

GEVERS, D. et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 382-392, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>

GROND, K. et al. The avian gut microbiota: Community, physiology and function in wild birds. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen, v. 49, n. 11, p. e01788, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jav.01788>.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, London, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)

GUINET, C.; JOUVENTIN, P.; GEORGES, J. Y. Long term population changes of fur seals *Arctocephalus gazella* and *Arctocephalus tropicalis* on subantarctic (Crozet) and subtropical (St. Paul and Amsterdam) Islands and their possible relationship to El Niño Southern Oscillation. **Antarctic Science**, Oxford, v. 6, p. 473-478, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102094000714>

GUO, J. et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 105, n. 27, p. 9145-9150, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0804023105>

GUZZARDI, M. A. et al. Fetal cardiac growth is associated with in utero gut colonization. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Heidelberg, v. 29, n. 2, p. 170-176, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.10.005>

HAMADY, M. et al. Error correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 3, p. 235-237, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1184>

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, n. S1, p. 1S-11S, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x>

HOFMEYR, G. J. G.; BESTER, M. N. Subantarctic Fur Seal. **Encyclopedia of Marine Mammals**, [S.l.], p. 957-960, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00252-1>.

HUGON, P. et al. Repertoire of human gut microbes. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 106, p. 103-112, 2017. . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020>

IKEDA-OHTSUBO, W. et al. How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. **Frontiers in Nutrition**, Lausanne, v. 5, p. 90, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090>

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, Berlin, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

JARMAN, S. N. et al. Adelie Penguin Population Diet Monitoring by Analysis of Food DNA in Scats. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e82227, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082227>

JIE, Z. et al. The gut microbiome In: atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature Communications**, London, v. 8, n. 1, p. 845, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00900-1>

JIN, Y. et al. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. **The Science of the Total Environment**, v. 649, p. 308-317, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353>

KANNAN, K. et al. A comparative analysis of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in southern sea otters that died of infectious diseases and noninfectious causes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 53, n. 2, p. 293-302, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0251-8>

KARLSSON, F. et al. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. **Diabetes**, New York, v. 62, n. 10, p. 3341-3349, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2337/db13-0844>

KATZ, H.; MORGADES, D.; CASTRO-RAMOS, M. Pathological and parasitological findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. **International Scholarly Research Notices**, ew York, v. 2012, id. 586079, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/586079>

KHANNA, S.; TOSH, P.K. A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 89, n. 1, p. 107-114, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.10.011>

KIGHT, C. R.; SWADDLE, J. P. How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. **Ecology Letters**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1052-1061, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01664.x>

KLEPAC-CERAJ, V. et al. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1293-1303, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02173.x>

KLUGE, M. et al. Metagenomic Survey of Viral Diversity Obtained from Feces of Subantarctic and South American Fur Seals. **PLoS One**, San Francisco, v. v. 11, n. 3, p. e0151921, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151921>.

KNOPPERS, B.; EKAU, W.; FIGUEIREDO, A. G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. **Geo-Marine Letters**, [S.l.], v.19, n. 3, p. 171-178, 1999.

KOENIG, J. E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 108, suppl. 1, p. 4578-4585, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000081107>

KONG, F. et al. Characterization of the gut microbiota in the red panda (*Ailurus fulgens*). **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e87885, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087885>

KRISS, M. et al. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 44, p. 34-40, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>

LAFORST-LAPOINTE, I.; ARRIETA, M. C. Microbial eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies. **mSystems**, Washington, DC, v. 3, n. 2, pii: e00201-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00201-17>

LAGIER, J. C. et al. Human gut microbiota: repertoire and variations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 136, p. 1-18. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00136>. 2012

LAGIER, J. C. et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 18, n. 12, p. 1185-1193, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023>

LAGIER, J. C. et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 28, n. 1, p. 237-264, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14>

- LANCASTER, M. L. et al. Ménage à trois on Macquarie Island: Hybridization among three species of fur seal (*Arctocephalus* spp.) following historical population extinction. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 12, p. 3681-3692, 2006
- LAUER-JÚNIOR, C. M. et al. Fecal Eukaryotic Community of Wild Young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic Fur Seals (*Arctocephalus tropicalis*). **Annals of Marine Biology and Research**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 1025, 2017
- LEVESQUE, C. L. et al. Alterations in ileal mucosa bacteria related to diet complexity and growth performance in young pigs. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e108472, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108472>
- LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, New York, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- LIAUCHONAK, I. et al. Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 3, p. E644, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11030644>
- LITTNAN, C. L.; ARNOULD, J. P. Y.; HARCOURT, R. G. Effect of proximity to the shelf edge on the diet of female Australian fur seals. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, n. 338, p. 257-267, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps338257>
- LIU, H. N. et al. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: a systematic review and meta-analysis. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 49, n. 4, p. 331-337, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.01.1>
- LIU, L. et al. Comparison of Next- Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 2012, p. 251364, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- LONGO, L. L.; AMADO FILHO, G. M. O conhecimento da fauna marinha bentônica brasileira através dos tempos. **História, Ciências, Saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 995-1010, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-59702014000300011>
- LU, J. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003>

- LUCAS, F. S.; HEEB, P. Environmental factors shape cloacal bacterial assemblages. In: great tit *Parus major* and blue tit *P. caeruleus* nestlings. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 510-516, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03479.x>
- LUKEŠ, J. et al. Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals?. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e1005039, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005039>
- MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1035-1045, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1035s>
- MÄDER, A.; SANDER, M.; CASA, G. Ciclo Sazonal de Mortalidade do Pinguim-de-Magalhaes, *Spheniscus Magellanicus* Influenciado por Fatores Antrópicos e Climáticos na Costa do Rio Grande Do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 228-233, 2010.
- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 95-102, 2005.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- MEDEIROS, A. W. et al. *Enterococcus* species diversity in fecal samples of wild marine species as determined by real-time PCR **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 129-136, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0427>
- MENAFRA, R. et al. **Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya**. Montevideo: Vida Silvestre Uruguay, 2006.
- MILOSLAVICH, P. et al. Marine Biodiversity in the Atlantic and Pacific Coasts of South America: Knowledge and Gaps. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e14631, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014631>
- MOS, L. et al. Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 25, n. 12, p. 3110-3117, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1897/06-027R.1>
- MULLER, A.; BARROS, M. P. Diversidade e abundância de aves costeiras em um trecho do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 26, n. 3, p. 163-175, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n3p163>
- NAYA, D. E.; ARIM, M.; VARGAS, R. Diet of south american fur seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay. **Marine Mammal Science**, Fort Wayne, v. 18, n. 3, p. 734-745, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01070.x>



NELSON, T. **Factors influencing the gut microbiota of Antarctic seals**. Sydney: University of New South Wales, 2012.

NELSON, T. M. et al. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 1132-1145, 2013.

NELSON, T. M. et al. The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. **Microbiology Australia**, Melbourne, v. 36, n. 1, p. 8-13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/MA15004>

NELSON, T. M.; ROGERS, T. L.; BROWN, M. V. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e83655, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083655>

NISHINO, K. et al. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 53, n. 1, p. 95-106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1384-4>.

O'SULLIVAN, O. et al. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 1, p. 214-221, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dks348>

OLESIUK, P. F. Annual prey consumption by harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Strait of Georgia, British Columbia. **Fishery Bulletin**, Washington, DC, v. 91, n. 3, p. 491-515, 1993.

OLIVEIRA, L. R. **Carnívoros marinhos mamíferos do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2013.

OLIVEIRA, L. R. **Estudo da ecologia alimentar dos pinípedes (Pinnipedia, Otariidae e Phocidae) ocorrentes no litoral norte do estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

OLIVEIRA, L. R.; OTT, P. H.; MALABARBA, L. R. Ecologia alimentar dos pinípedes do sul do Brasil e uma avaliação de suas interações com atividades pesqueiras. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; DOS SANTOS, G. A. S. D. (Ed.). **Ecologia de mamíferos**. Londrina: Technical Books, 2008. p. 93-112.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 7, p. e177, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>

PAMER, E. G. Immune responses to commensal and environmental microbes. **Nature Immunology**, New York, v. 8, n. 11, p. 1173-1178, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1526>

PARFREY, L. W.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R. Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 153, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00153>

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, Springfield, v. 118, n. 2, p. 511-521, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>

PEREIRA, E. M. et al. Digenetic Trematodes in South American Sea Lions from Southern Brazilian Waters. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 99, n. 5, p. 910-913, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1645/GE-3216.1>.

PEREZ-MUÑOZ, M. E. et al. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome**, London, v. 5, n. 1, p. 48, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>

PETERSEN, C.; ROUND, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 1024-1033, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>

PETERSON, D. A. et al. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 3, n. 6, p. 417-427, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.001>

PINEDO, M. C.; ROSAS, F. C. W.; MARMONTEL, M. **Cetáceos e pinípedes do Brasil: uma revisão dos registros e guia de indentificação das espécies**. Manaus: United Nations Environment Program, 1992.

PINTO, M. B. L. C.; SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A. P. M. Stomach contents of the Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil. **Marine Ornithology**, Rondebosch, v. 35, p. 77-78. 2007.

PORTILHO-RAMOS, R. C.; BARBOSA, C. F.; RIOS-NETTO, A. M. Planktonic foraminiferal variations in the southwestern Atlantic since the last glacial–interglacial cycle. **Palaios**, [S.l.], v. 29, p. 38-44, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2110/palo.2012.104>

POTTI, J. et al. Bacteria diverts resources from growth for magellanic penguin chicks. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 709-714, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00375.x>

PÜTZ, K. et al. Post-moult movements of sympatrically breeding Humboldt and Magellanic penguins in south-central Chile. **Global Ecology and Conservation**, Amsterdam, v. 7, p. 49-58, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.05.001>

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08821>

QUAIL, M. A. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 341, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 996-1047, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>

RAMBO, B. **Fisionomia do Rio Grande do Sul**: ensaio de monografia natural. 3. ed. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2000.

REUTER, J. A.; SPACEK, D.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 58, n. 4, p. 586-597, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 10, p. 1595-1608, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, London, v. 475, n. 7356, p. 348-352, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10242>

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

SCHIRMER, M. et al. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, n. 6, p. e37, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>

SCHLOISSNIG, S. et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**, London, v. 493, n. 7430, p. 45-50, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11711>

SCHOLZ, M. B.; LO, C. C.; CHAIN, P. S. G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 1, p. 9-15, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.013>

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, Silver Spring, v. 18, n. 1, p. 190-195, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, Washington, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2009>

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

- SILVEIRA, I. C. A. et al. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 171-183, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-77392000000200008>
- SKEWGAR, E.; BOERSMA, P. D.; SIMEONE, A. Winter migration of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the southeastern Pacific. **Waterbirds**, De Leon Springs, v. 37, n. 2, p. 203-209, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1675/063.037.0208>
- SMITH, P. M. et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, New York, v. 341, n. 6145, p. 569-573, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- SMITH, S. C. et al. Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* gut microbiota. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 246-255, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12157>
- SPEICH, B. et al. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 1, p. 87-99, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00349-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00349-7)
- STEFKA, A. T. et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 111, p. 13145-13150, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1412008111>
- STOKES, D. L. et al. Conservation of migratory Magellanic penguins requires marine zoning. **Biological Conservation**, New York, v. 170, p. 151-161, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.024>
- SZYCHLINSKA, M. A. et al. A correlation between intestinal microbiota dysbiosis and osteoarthritis. **Heliyon**, London, v. 5, n. 1, p. e01134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01134>
- TAKAHASHI, K. et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease. **Digestion**, Basel, v. 93, n. 1, p. 59-65, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000441768>
- TAP, J. et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 2574-2584, 2009. . DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>
- TARNECKI, A. M. et al. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 123, n. 1, p. 2-17, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13415>

THE IUCN Red List Of Threatened Species: Version 2017.3. [2018]. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/summary/22697822/0>. Acesso em: 13 maio 2018.

TOROK, V. A. et al. **Environment and age**: impact on poultry gut microflora. Sydney: Australian Poultry Science Symposium, 2007.

TREVELLINE, B. K. et al. In ovo microbial communities: a potential mechanism for the initial acquisition of gut microbiota among oviparous birds and lizards. **Biology Letters**, London, v. 14, n. 7, p. 20180225, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2018.0225>.

TÚNEZ, J. I.; CAPPOZZO, H. L.; CASSINI, M. H. Natural and anthropogenic factors associated with the distribution of South American sea lion along the Atlantic coast. **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 598, n. 1, p. 191-202, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-9150-x>

VAISHAMPAYAN, P. A. et al. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 2, p. 53-66, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evp057>

VALERIANO, V. D.; BALOLONG, M. P.; KANG, D-K. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 122, n. 3, p. 554-567, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13364>

VAZ-FERREIRA, R. Ecologia terrestre y marina de los pinnipedios Del atlântico sudoccidental. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 179-191, 1965.

VENTURA, M. et al. Selected aspects of the human gut microbiota. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 75, n. 1, p. 81-82, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2669-8>

WAINER, I.; VENEGAS, S. A. South Atlantic Multidecadal Variability in the Climate System Model. **Journal of Climate**, Boston, v. 15, p. 1408, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1175/1520-0442\(2002\)015<1408:SAMVIT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(2002)015<1408:SAMVIT>2.0.CO;2)

WARGO, M. J.; HOGAN, D. A. Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 359-364, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.001>

WEGE, M. et al. Trend changes in sympatric subantarctic and Antarctic fur seal pup populations at Marion Island, Southern Ocean. **Marine Mammal Science**, Fort Wayne, v. 32, n. 3, p. 960-982, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/mms.12306>

WELDON, L. et al. The Gut Microbiota of Wild Mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0134643, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134643>.

WILCZYŃSKA, P.; SKARŻYŃSKA, E.; LISOWSKA-MYJAK, B. Meconium microbiome as a new source of information about long-term health and disease: questions and answers. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, New York, v. 4, p. 681-686, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1387888>.

WOODS, R. W.; WOODS, A. **Atlas of breeding birds of the Falkland Islands**. Oswestry: Anthony Nelson, 1997.

XIMENEZ, C.; TORRES, J. Development of microbiota in infants and its role in maturation of gut mucosa and immune system. **Archives of Medical Research**, New York, v. 48, n. 8, p. 666-680, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.007>.

YAN, W. et al. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 45308, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep45308>

YILDIRIM, S. et al. Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. e13963, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013963>

YIN, Y. et al. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 3, p. 367-376, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.128>

ZAVALAGA, C. B.; PAREDES, R. Records of Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus* in Peru. **Marine Ornithology**, Rondebosch, v. 37, p. 281-282, 2009

## **APÊNDICES**

## Artigos publicados durante o doutorado



## Mini Review

Volume 8 Issue 2 - February 2018  
DOI: 10.19080/AIBM.2018.08.555731

Adv Biotech &amp; Micro

Copyright © All rights are reserved by Ana Paula Guedes Frazzon

## Modulation of Gene Expression by Essential Oils in Bacteria



Ana Paula Guedes Frazzon<sup>1\*</sup>, Marcos Saldanha<sup>1</sup>, Claudio Lauer Junior<sup>1,2</sup> and Jeverson Frazzon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Feevale University, Brazil

<sup>3</sup>Department of Food Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Int. J. Environ. Sci. Technol.  
DOI 10.1007/s13762-017-1430-z



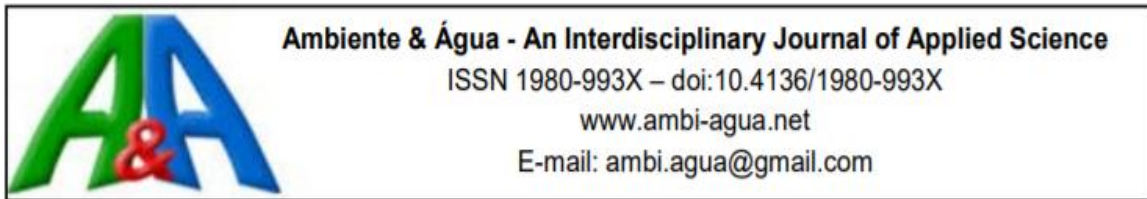
ORIGINAL PAPER

### Toxicity of vegetable tannin extract from *Acacia mearnsii* in *Saccharomyces cerevisiae*

C. A. Timotheo<sup>1</sup> C. M. Lauer Jr.<sup>1,2</sup>

Received: 12 October 2016/Revised: 23 May 2017/Accepted: 13 July 2017  
© Islamic Azad University (IAU) 2017





## **Efficacy of a solar still in destroying virus and indicator bacteria in water for human consumption**

**ARTICLES** [doi:10.4136/ambi-agua.2084](https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2084)

**Received: 28 Jan. 2017; Accepted: 03 Jun. 2018**

**Felipe Tiago do Nascimento<sup>1\*</sup>; Carlos Augusto do Nascimento<sup>1</sup>;  
Fernando Rosado Spilki<sup>2</sup>; Rodrigo Staggemeier<sup>2</sup>; Cláudio Marcos Lauer Júnior<sup>2</sup>**