IRYS HANY LIMA GONZALEZ

Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas

São Paulo
2021

IRYS HANY LIMA GONZALEZ

Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

IRYS HANY LIMA GONZALEZ

Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Locosque Ramos

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Hany Lima Gonzalez, Irys
Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas / Irys Hany Lima Gonzalez; orientador José Gregorio Cabrera Gomez; coorientador Patrícia Locosque Ramos. -- São Paulo, 2021.
133 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiota. 2. Polihidroxialcanoatos. 3. Ramnolipídeos. 4. Animais silvestres. 5. Isolados bacterianos. I. Cabrera Gomez, José Gregorio, orientador. II. Locosque Ramos, Patrícia , coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Irys Hany Lima Gonzalez

Título da Tese: Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Locosque Ramos

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 01/12/2021 considerou

(X) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinado(a): p/ Assinatura: .....
Nome: Luciana Teresa Dias Cappelini
Instituição: UNIFESP - DIADEMA

Examinado(a): p/ Assinatura: .....
Nome: Julio Cezar Franco de Oliveira
Instituição: UNIFESP - DIADEMA

Examinado(a): p/ Assinatura: .....
Nome: Suzan Pantaroto de Vasconcellos
Instituição: UNIFESP - DIADEMA

Examinado(a): p/Assinatura: .....
Nome: Renata Castiglioni Pascon
Instituição: UNIFESP - DIADEMA

Examinado(a): Assinatura: .....
Nome: Luiziana Ferreira da Silva
Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas USP

Presidente: p/ Assinatura: .....
Nome: Patrícia Locosque Ramos
Instituição: FPZSP - Fundação Parque Zoologico de São Paulo

Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 089/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Ecologia e comportamento da raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em áreas antropizadas de Cerrado no Brasil Central", sob a responsabilidade de **Frederico Gemesio Lemos** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **24 de outubro de 2014.**

(We certify that the protocol nº 089/14, about "Ecologia e comportamento da raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em áreas antropizadas de Cerrado no Brasil Central", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 24/10/2014).

Uberlândia, 28 de outubro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Goiânia, 10 de novembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 086/14

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Outros – projeto isolado

II - Identificação:

- **Título do projeto:** Projeto ecologia e conservação da raposa-do-campo (*Lycalopexvetulus*) em áreas antropizadas de Cerrado no Brasil Central
- **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Frederico Gemesio Lemos/ Regional Catalão
- **Pesquisadores Participantes:** Frederico Gemesio Lemos, Fernanda C. de Azevedo, Ricardo Corasa Arrais, Mozart Caetano de Freitas Júnior
- **Unidade onde será realizado:** Regional Catalão
- **Data de apresentação a CEUA:** 19/09/14

III - Objetivos e justificativa do projeto: Aumentar o conhecimento sobre a ecologia da espécie e conhecer sua relação com outros carnívoros sintópicos em fazendas de gado no município de Cumari, Goiás, Brasil. Os objetivos específicos do projeto são: 1) descrever a área de vida, o uso de habitat, o padrão de atividade e o comportamento social da raposa-do-campo em um ambiente alterado com matriz de pastagens antrópicas e fragmentos de cerrado; 2) descrever o cuidado do casal à prole, a dieta, idade da dispersão dos filhotes e o sexo que dispersa; e 3) descrever a sobreposição de nicho espacial e as interações da espécie com outros canídeos sintópicos.

IV - Sumário do projeto:

- **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** O projeto propõe a investigação dos processos ecológicos de canídeos silvestres. Estas questões permeiam o acompanhamento de indivíduos de vida livre, através da captura e instalação de coleira radiotransmissora, para obtenção de dados ecológicos e comportamentais dificilmente obtidos utilizando-se de outra metodologia. O número de animais a serem empregados na pesquisa foi estabelecido baseado em um projeto piloto realizado na área de estudo utilizando focagem noturna e 30 armadilhas fotográficas (que possuem sensores de calor e movimento que disparam automaticamente) entre os anos de 2013 e 2014.
- **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizadas 3 diferentes espécies, a saber: *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo) com peso de 2.5kg - 4.2kg, *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) com peso de 6 kg – 8 kg, *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) com peso de 20kg - 30kg. Todos da linhagem Canidae, todos adultos e subadultos, entre machos e fêmeas.
- **Espécie e número total de animais utilizados:** Serão utilizadas: 30 *Lycalopex vetulus*, sendo 15 fêmeas e 15 machos; 30 *Cerdocyon thous*, sendo 15 fêmeas e 15 machos; 08 *Chrysocyon brachyurus*, sendo 04 fêmeas e 04 machos.
- **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Serão capturados canídeos de vida vidra livre na área de

estudo, localizada na Região do Limoeiro, município de Cumari, Goiás, Brasil. Os animais serão observados em seu habitat natural.

- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não se aplica. Por se tratar da captura de carnívoros silvestre em área natural, toda a equipe deve estar preparada para eventuais riscos. Para que todo o procedimento anestésico e a coleta de dados, incluindo a vistoria presencial das armadilhas, os integrantes deste projeto de pesquisa possuem cursos e especializações no manejo de fauna silvestre. Será utilizada pela equipe durante toda execução das atividades equipamentos de proteção física como roupas resistentes, perneiras, luvas de couro, chapéus ou bonés, botas antiderrapantes e resistentes à água. A equipe também dispõe de cambão com cabo de 1,80 m, puçá de aro grande, arma anestésica reserva (pistola e zarabatana), lanternas potentes, equipamento de telemetria e sistema de rádio comunicação. Obrigatoriamente todos os membros da equipe executora estão devidamente protegidos contra a raiva (carteira de vacinação e sorologia atualizados), febre amarela e tétano.
- ❑ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** Vide pág. 18 a 21 do projeto de pesquisa.
- ❑ **Método de eutanásia:** Não se aplica.
- ❑ **Destino do animal:** Permanecerá em seu ambiente natural.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto a documentos:** A documentação está de acordo com o exigido pela CEUA/UFG.
- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** As informações constantes no projeto e ficha protocolo quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores estão de acordo com princípios éticos indicados pelo CONCEA.

V - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Reiteramos a importância deste parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

VI - Data da reunião: 10/11/14

Assinado de forma digital por RENATA MAZARO:12343522812
Dados: 2014.11.14 13:12:52 -02'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

A minha avó, Dona Cida, por todo incentivo, motivação e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe Marcia, e minhas irmãs Lizzie e Vitória, pelo amor e apoio incondicional. Sem vocês nada seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela compreensão e ensinamentos.

A minha co-orientadora e chefe Profa. Dra. Patrícia Locosque Ramos. Serei sempre grata pelos ensinamentos, motivação, inspiração e apoio profissional, acadêmico e emocional.

A Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade de fazer parte de um grupo de referência e realizar este trabalho.

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo, instituição na qual estou empregada, por permitir e viabilizar a execução deste trabalho, contribuindo com meu crescimento profissional e acadêmico

A todos os integrantes e colaboradores do Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, por toda a ajuda em campo para a obtenção das amostras para este trabalho e discussões cientificas. Agradeço ao Frederico Lemos e Fernanda Cavalcanti, pela hospitalidade e pela oportunidade de trabalhar com uma equipe excepcional. Vocês são admiráveis e inspiradores!

A todos os colegas que passaram pelo do DPA do Zoo de São Paulo, funcionários, aprimorandos, estagiários e voluntários, pelo convívio e troca de experiências diárias. Agradeço especialmente ao colega Caio Motta, por intermediar a viabilização deste trabalho junto ao PCMC e por toda a colaboração e apoio.

Aos colegas dos Laboratórios de Bioprodutos do ICB-USP, pela colaboração nos experimentos, principalmente em biorreatores.

Aos meus amigos de longa data Bruna, Fabio, Fabiana e Karen por me motivarem nos momentos difíceis e por tornarem a trajetória mais leve.

Muito obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse realizado.

H.L.G, I. **Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de canídeos e aplicações biotecnológicas**. 2021. 133F. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), são canídeos que vivem no Cerrado e estão sob constantes ameaças entre elas a transmissão de doenças infecciosas. Neste contexto, amostras dos canídeos silvestres do cerrado, bem como dos cães domésticos que habitam uma mesma região foram obtidas para um estudo de bactérias cultiváveis presentes em cavidade oral e retal destes animais. Foram obtidos 1535 isolados bacterianos ciopreservados para o estabelecimento de uma coleção de culturas. Foram identificados potenciais patógenos e novas associações entre microrganismo e hospedeiros foram descritas, evidenciando o quanto a microbiota de canídeos silvestres é pouco conhecida.

Para demonstrar o potencial biotecnológico de uma coleção de culturas provenientes de animais silvestres, microrganismos selecionados foram testados para a avaliação da produção de biopolimeros como os polihidroxialcanoatos e os biossurfactantes, como ramnolipídeos. Para a produção em escala industrial, o grande desafio é torná-la economicamente viável. Para isso, algumas estratégias são utilizadas, dentre elas, a prospecção de microrganismos que apresentem uma boa capacidade de produção a partir de substratos baratos e renováveis. Neste trabalho, foram encontrados microrganismos capazes de produzir polihidroxialcanoatos e ramnolipídeos, sendo que um isolado, MA09B que apresentou melhores resultados para a produção de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol, um subproduto do biodiesel, foi selecionado para ensaios em biorreatores. Este isolado apresentou resultados promissores para futuros ajustes para aplicação em escala industrial, o que indica que isolados bacterianos em animais silvestres podem ser uma nova fonte para a busca de bons produtores de polihidroxialcanoatos e ramnolipídeos. O estudo taxonômico e fenotípico de *Pseudomonas* sp. MA09B e 416O foi realizado, e demonstrou que, em ambos os casos, testes adicionais são necessários para determinar sua posição taxonômica ou possível nova descrição de espécie.

Palavras-chave: microbiota, animais silvestres, polihidroxialcanoatos, ramnolipídeos, canídeos, cão doméstico.

H.L.G, I. **Bacterial diversity in oral and rectal samples from canids and its application in biotechnology**. 2021. 133 p. Ph. D. these (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the hoary-fox (*Lycalopex vetulus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) are canid species that inhabit the Cerrado biome. These species currently endure a variety of threats, of which infectious disease is significant. In this context, samples of wild canids from the Cerrado biome and domestic dogs that inhabit the same region were obtained for a study of cultivable bacteria in their oral and rectal cavities. 1535 bacterial isolates were obtained and cryopreserved and a culture collection was established. Potential pathogens were identified and new associations between microorganisms and hosts were described, showing how scarce the knowledge about the microbiota of wild canids is. To demonstrate the biotechnological potential of a collection of cultures from wild animals, selected microorganisms were tested to evaluate the production of biopolymers such as polyhydroxyalkanoates and biosurfactants like rhamnolipids. While both have the potential to be produced on an industrial scale, this process is often limited by its economic feasibility. For this, some strategies can be applied, among them, the prospection of microorganisms that present good production capacity from cheap and renewable substrates. In this study, microorganisms capable of producing polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids were found, and an isolate, MA09B, which presented better results to produce polyhydroxyalkanoates using glycerol, a biodiesel by-product, was selected for tests in bioreactors. This strain showed promising results for future adjustments for application on an industrial scale, which indicates that bacterial isolates in wild animals may be a new source for the search for good producers of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. A taxonomic and phenotypic study of *Pseudomonas* sp. MA09B and 416O was performed, and demonstrated that, in both cases, additional tests are needed to determine their taxonomic position or possible new species description.

Keywords: microbiota, wildlife, polyhydroxyalkanoates, rhamnolipidis, canids, dog

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da região do Município de Cumari..... 34
Figura 2 - Prevalência por Filo bacteriano em cavidade oral..... 46
Figura 3 - Prevalência por Família bacteriana em cavidade oral..... 47
Figura 4 - Prevalência por Gênero bacteriano em cavidade oral..... 48
Figura 5 - Prevalência por Filo bacteriano em amostra retal..... 49
Figura 6 - Prevalência por Família bacteriana em amostra retal..... 50
Figura 7 - Prevalência por Gênero bacteriano em amostra retal..... 51
Figura 8 - Diagrama de Venn para gêneros bacterianos em cavidade oral (A) e retal (B)..... 52
Figura 9 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de MA09B, construída através do método Máxima Verossimilhança, utilizando Kimura-2-parâmetros..... 62
Figura 10 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de MA09B, construída através do método Neighbour-joining, utilizando distância p..... 63
Figura 11 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de 416O, construída através do método Máxima Verossimilhança, utilizando Kimura-2-parâmetros..... 63
Figura 12 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de 416O, construída através do método Neighbour-joining, utilizando distância p..... 64
Figura 13 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*B para o isolado MA09B, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 67
Figura 14 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*B para o isolado 416O, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 68
Figura 15 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*D para o isolado MA09B, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 70
Figura 16 - Topologia de Árvore filogenética do gene *rpo*D para o isolado 416O, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 71
Figura 17 - Topologia de árvore filogenética do gene *gyr*B para o isolado MA09B, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 72

Figura 18 - Topologia de árvore filogenética do gene *gyr*B para o isolado 416O, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 73
Figura 19 - Topologia de árvore filogenética de MLSA para o isolado MA09B, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 75
Figura 20 - Topologia de árvore filogenética de MLSA para o isolado 416O, construída através do método Neighbour-joining e distância p..... 76
Figura 21 - Microscopia eletrônica de *Pseudomonas aeruginosa* com grânulos intracelulares..... 84
Figura 22 - Três principais vias metabólicas para a produção de PHA..... 85
Figura 23 - Concentração de glicerol durante as culturas em biorreatores..... 103
Figura 24 - Biomassa total, biomassa residual e produção de PHA por *Pseudomonas* sp. MA09B em culturas em biorreatores..... 105
Figura 25 - Composição dos monômeros de PHA por Pseudomonas sp. MA09B em culturas em biorreatores..... 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados para MLSA..... 42
Tabela 2 - Prevalência de gêneros bacterianos por tipo de amostra..... 52
Tabela 3 - Sequências utilizadas para MLSA..... 65
Tabela 4 - Número de acesso das sequências depositadas no GenBank..... 77
Tabela 5 - Resultados de testes fenotípicos em API20NE..... 79
Tabela 6 - Composição dos meios de cultura para ensaios em agitador rotativo..... 91
Tabela 7 - Composição do Meio Mineral para ensaio em biorreator..... 93
Tabela 8 - Produção de PHA em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono..... 98
Tabela 9 - Produção de ramnolipídeos em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono..... 98
Tabela 10 - Produção de PHA em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono..... 99
Tabela 11 - Produção de ramnolipídeos em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono..... 99
Tabela 12 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. MA09B em ensaios em agitadores rotativos após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono..... 101
Tabela 13 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 em ensaios em agitadores rotativos após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitro
µM	micromolar
3HD	3-hidroxidecanoato
3HDD	3-hidroxidodecanoato
3HDDΔ5	3-hidroxi-5-dodecenoato
3HHx	3-hidroxihexanoato
3HO	3-hidroxioctanoato
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CLED	Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
*gyr*B	gene da subunidade beta da girasse
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICNP	International Code of Nomenclature of Prokaryotes
IUCN	International Union for Conservation of Nature
Kg	kilograma
L	litro
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
Mg	miligrama
mL	mililitro
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
mM	millimolar
ng	nanograma
pb	pares de base
PCMC	Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado
PCR	reação de polimerase em cadeia
PHA	polihidroxialcanoatos
phaC	PHA sintase

PHAmcl	medium chain lenght polihidroxialcanoatos
PHAscl	short chain lenght polihidroxialcanoatos
PHB	polihidroxibutirato
*rpo*B	gene da subunidade beta da RNA polimerase
*rpo*D	gene do fator sigma da RNA polimerase
rRNA	RNA ribossomal
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Unidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - DIVERSIDADE BACTERIANA EM CAVIDADE ORAL E RETAL DE CANÍDEOS

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24

2.1 Canídeos silvestres 24

2.1.1 Lobo-guará 24

2.1.2 Cachorro-do-mato 25

2.1.3 Raposa-do-campo 26

2.1.4 Cães domésticos 26

2.2 Diversidade microbiana e patógenos em canídeos silvestres 28

2.3 Técnicas para identificação de microrganismos 29

2.4 Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado 31

3 OBJETIVOS 33

4 MATERIAL E MÉTODOS 34

4.1 Área de estudo 34

4.2 Animais amostrados 34

4.3 Captura dos animais 35

4.4 Amostragem de cães domésticos 35

4.5 Coleta e acondicionamento de amostras 36

4.6 Cultivo, isolamento e preservação dos microrganismos 36

4.7 Identificação dos microrganismos 38

4.7.1 *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight* (MALDI-TOF) 38

4.7.2 Extração do DNA Genômico 39

4.7.3 Amplificação dos fragmentos de 16S rRNA 39

4.7.4 Purificação dos fragmentos de PCR 40

4.7.5 Sequenciamento do gene 16S rRNA 40

4.7.6 Análises de Bioinformática 40

4.7.10 Análise de Multilocus Sequence Analysis (MLSA) 41

4.8 Testes fenotípicos 43

4.9 Compilação e análise dos dados 43

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

5.1 Obtenção das amostras 44

5.2 Estabelecimento de protocolo para o processamento das amostras 44
5.3 Microrganismos identificados 45
5.3.1 Cavidade oral 46
5.3.2 Amostras retais.....49
5.4 Diversidade bacteriana.....54
5.4.1 Saúde humana 56
5.4.2 Saúde animal 56
5.4.3 Saúde ambiental.....58
5.5 Estabelecimento da coleção de cultura.....59
5.6 Análises moleculares.....60
5.6.1 Análise de 16S rRNA.....61
5.6.2 Análise dos genes housekeeping 64
5.6.3 Análise MLSA 74
5.7 Testes fenotípicos.....77
6 CONCLUSÃO 80
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DE POTENCIAL DE BACTÉRIAS OBTIDAS DE CANÍDEOS SILVESTRE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS
1 INTRODUÇÃO 82
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....84
2.1 Polihidroxialcanoatos.....84
2.2 Ramnolipídeos 87
2.3 O gênero Pseudomonas.....88
3 OBJETIVOS.....90
4 MATERIAL E MÉTODOS.....91
4.1 Isolados analisados.....91
4.2 Ensaio em agitadores rotativos para a produção de PHA.....91
4.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos 92
4.4 Ensaios em biorreator 93
4.5 Metodologia analítica.....94
4.5.1 Determinação da biomassa.....94
4.5.2 Determinação do pH.....94
4.5.3 Determinação do teor e composição de PHA.....94
4.5.4 Determinação da concentração de glicerol 95
4.5.5 Determinação da concentração de ramnolipídeos 95

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....96
5.1 Ensaio em agitador rotativo.....96
5.1.1 Cultivo em meio mineral contendo glicose ou óleo de soja como fonte de carbono 96
5.1.2 Cultivo em meio mineral contendo diferentes carboidratos como fonte de carbono 100
5.2 Ensaio em biorreator.....102
6 CONCLUSÃO 107
REFERÊNCIAS.....108
APÊNDICES
A - FORMULÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIAS....125
B - PREVALÊNCIA DOS FILOS BACTERIANOS POR TIPO DE AMOSTRA.....126
C - PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS BACTERIANAS POR TIPO DE AMOSTRA .127
D - MATRIZ DE DISTÂNCIA DO GENE 16S RRNA PARA O ISOLADO MA09B ..130
E - MATRIZ DE DISTÂNCIA DO GENE 16S RRNA PARA O ISOLADO 416O.....131
F - MATRIZ DE DISTÂNCIA DOS GENES *HOUSEKEEPING* E MLSA DO ISOLADO MA09B 132
G - MATRIZ DE DISTÂNCIA DOS GENES *HOUSEKEEPING* E MLSA DO ISOLADO 416O 133

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi norteado por duas principais linhas: a diversidade bacteriana e a avaliação do pontencial biotecnológico. Para uma melhor compreensão de como o trabalho foi conduzido, esta tese está dividida em dois capítulos.

No primeiro capítulo, discorre-se sobre a diversidade bacteriana em canídeos silvestres e cães domésticos de uma região do bioma Cerrado e no segundo capítulo, apresenta-se a etapa do trabalho onde parte do potencial biotecnológico das bactérias isoladas foi avaliado.

Devido a complexidade que envolve o acesso aos animais silvestres para a obtenção de amostras, a execução desta etapa foi viabilizada através de uma parceria entre a Fundação Parque Zoológico de São Paulo e o Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, cujo responsável é membro da Universidade Federal de Goiás e vinculado à Universidade Federal de Uberlândia. Diante do exposto, a apresentação de certificado de aprovação do Comitê de Ética emitido pelas Instituições mencionadas, se justifica.

CAPÍTULO I - DIVERSIDADE BACTERIANA EM CAVIDADE ORAL E RETAL DE CANÍDEOS

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, de grande importância biológica e de alta biodiversidade, porém somente 7% do bioma é protegido por Unidades de Conservação (CORREA *et al.*, 2020). Devido à intensa ocupação humana, estima-se que cerca de 50% da vegetação nativa tenha sido substituída por pastagens para a criação de gado e aréas agrícolas, podendo ocasionar uma intensa redução da biodiversidade (FERRAZ-ALMEIDA & DA MOTTA, 2020; MATOSAK, *et al*., 2022)

A região do Cerrado possui estações do ano muito bem definidas, divididas em úmida e quente ou seca e fria, característica que pode interferir na disponibilidade de alimentos aos animais que ali vivem e consequentemente, em sua dieta (LEMOS & FACURE, 2011).

O sudeste do estado de Goiás está presente no centro deste Bioma e sofre com o impacto da ação humana. Essa área pode ser caracterizada como um mosaico de fitofisionomias, compreendido por pastos abertos à vegetação mais densa e com possível presença de fragmentos remanescentes de Mata Atlântica. Mesmo com estes impactos e a grande presença de pastos para a criação de gado na região é possível encontrar uma diversidade de carnívoros como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus)*, a onça-parda (*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (LEMOS *et al.*, 2011).

Embora nenhuma das espécies de canídeos esteja classificada como ameaçadas de extinção, todas estão sob algum grau de vulnerabilidade e sofrem com a perda de habitat e ação antrópica. Cachorro-do-mato e raposa-do-campo, por exemplo, vivem sob ameaças como envenenamento, perseguição por cães domésticos e atropelamentos (LEMOS *et al.*, 2011).

As populações naturais também são ameaçadas com a transmissão de patógenos interespecíficas e, os canídeos selvagens podem tanto sofrer declínios através de doenças transmitidas por cães domésticos, como ser altamente

adaptadas ao ambiente antropizado, atuando como reservatório de doenças (AGUIRRE, 2009). Devido a essa preocupação, muitos pesquisadores têm desenvolvido trabalhos para a detecção de possíveis patógenos, principalmente que possam ser transmitidos por animais domésticos, como por exemplo, estudos epidemiológicos populações naturais de animais selvagens, que contribuem para o conhecimento da dinâmica de transmissão de patógenos, já que 60% das doenças infecciosas emergentes são consideradas zoonoses (JONES *et al.*, 2007).

Em 2004, um esforço integrado entre pesquisadores de diversas áreas deu origem ao conceito chamado One World, One heatlh, através do estabelecimento dos princípios de Manhattan, que foi atualizado em 2019, com a criação dos princípios de Berlim (GRUETZMACHER *et al.*, 2021). Estes princípios sugerem a integração entre os estudos relacionados a saúde animal, humana e ambiental, visando melhorar o conhecimento e contribuir com a aplicação de soluções quando se trata de doenças infecciosas emergentes, zoonoses, sensibilidade a antibióticos, proteção ambiental e segurança alimentar (FRANK, 2008; GRUETZMACHER *et al.*, 2021).

Em relação a saúde animal, existe uma grande preocupação com patógenos generalistas que podem ser transmitidos de animais domésticos aos silvestres. Exemplos bem conhecidos são os vírus da raiva e da cinomose, que foram responsáveis pelo declínio de populações de diversos canídeos e felídeos silvestres como o cão selvagem africano, leões, lobo-etíope (LAURESON *et al.*, 2005).

Embora este tipo de estudo ainda seja restrito, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, estudos relacionados a doenças causadas por protozoários e vírus são mais encontrados do que estudos com doenças bacterianas, possivelmente pela dificuldade em se estabelecer um protocolo microbiológico em condições adequadas durante as capturas a campo.

Contudo, o campo da microbiologia além de abranger estudos de patógenos em potencial, permite ainda compreender os componentes da microbiota. A microbiota do trato gastrintestinal, por exemplo, é um sistema complexo, modulado por inúmeros fatores e de difícil entendimento sobre as interações e funções dos microrganismos que a compõem, portanto, o primeiro passo para sabermos seu papel em indivíduos saudáveis ou doentes é descrevê-la (GARCIA-MAZCORRO & MINAMOTO *et al.*, 2013).

No contexto de contribuir com a conservação de animais silvestres por meio

de pesquisa, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) vem atuando em diferentes projetos com atividades de campo (*in situ*) em parceria com o Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC), grupo de pesquisa que atua no Bioma Cerrado e reúne esforços de diferentes pesquisadores para promover a conservação dos mamíferos da região. Parte das atividades envolvem capturas e monitoramento de canídeos silvestres e avaliação da saúde de cães domésticos.

Nestas atividades são obtidos diferentes dados e amostras biológicas distribuídas para diversos projetos de pesquisa que visam contribuir com informações sobre a epidemiologia e ecologia relacionada a esses animais. Com a parceria entre FPZSP e PCMC, este trabalho tornou-se viável devido ao acesso dos animais para a obtenção de amostras.

A abordagem deste estudo visa demonstrar a relação de microrganismos encontrados em canídeos silvestres e cães domésticos de uma região com intensa atividade antrópica e agrossistêmica, através da descrição de microrganismos cultiváveis, ressaltado a importância de se implantar medidas de controle de doenças de canídeos na região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Canídeos silvestres

As espécies de canídeos silvestres que ocorrem naturalmente na região central do Brasil, caracterizada pelo bioma Cerrado são lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*). Embora a área amostrada neste trabalho venha sofrendo grandes alterações através de ações antrópicas pela criação de gado, ainda existem fragmentos de áreas de flora nativa.

2.1.1 Lobo-guará

O lobo-guará (*Chrysocyon* brachyurus) possui atualmente uma população de aproximadamente 17.000 indivíduos, sendo que 90% dessa população ocorre no Brasil (PAULA & DEMATTEO, 2015). Apesar de a espécie ser classificada como "*Near threatened*" ou quase ameaçada pela lista vermelha de espécies ameaçadas estabelecida pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), as populações naturais são ameaçadas pela constante redução do seu habitat, atropelamentos em estradas, conflitos com humanos e doenças transmitidas pelo contato com animais domésticos (PAULA & DEMATTEO, 2015).

O lobo-guará é considerado um animal onívoro, generalista, apresentando uma dieta composta por 49% de itens de origem animal e 51% de origem vegetal em estudos anteriores (CARVALHO, 1995).

Destaca-se o fato de os cães domésticos serem considerados uma séria ameaça para as populações de lobo-guará, por serem estimulados a perseguir os animais silvestres, o que muitas vezes resulta na morte do animal, e por atuarem como reservatórios de diversos patógenos em potencial para os lobos, porém a dinâmica epidemiológica ainda não é muito bem esclarecida (PAULA & DEMATTEO, 2015). Estudo parasitológico que analisou fezes de canídeos em um Parque Nacional demonstrou que todas as estruturas compatíveis com parasitas encontrados em amostras de cães domésticos também foram encontradas nas amostras de lobo-guará (DIB *et al.*, 2020).

Em estudo anterior, uma população de lobos-guará e de cães domésticos do sudeste do Brasil foi amostrada e testada para importantes patógenos virais como o vírus da cinomose, o vírus da parvovirose, adenovírus e coronavírus e foi verificada uma alta prevalência de anticorpos nos dois grupos de animais (CURI, 2012), em outro trabalho com lobos-guará, cachorros-do-mato e cães domésticos de uma mesma região detectou sorologicamente animais de todas as espécies positivos para Leishmaniose, importante doença de caráter zoonótico, indicando também que pode haver a transmissão de patógenos entre as populações de canídeos selvagens e cães domésticos (CURI, 2006).

2.1.2 Cachorro-do-mato

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) é uma espécie de canídeo classificada como "*Least concern*" ou pouco preocupante pela IUCN, pois ocorrem em abundância nas suas áreas naturais. É uma espécie que está presente na maioria dos habitats e é adaptável em áreas antropizadas, desflorestadas e onde há agricultura e sua maior ameaça é a transmissão de patógenos através do contato direto com cães domésticos (LUCHERINI, 2015).

É considerada uma espécie oportunista que se alimenta principalmente de frutas, artrópodes e pequenos vertebrados, que forrageiam aos pares na estação chuvosa, se alimentado principalmente de frutas e insetos e na estação seca apresentam hábitos de forrageio solitário, predando pequenos mamíferos (LEMOS, 2011).

Na percepção de pessoas que vivem em áreas rurais sobrepostas aos ambientes em que essa espécie vive, estes são considerados principalmente predadores de pequenos animais domésticos (SILVA *et al.*, 2020).

Trabalhos relatados a seguir demonstram uma evidência da expansão de atividades antrópicas em áreas de ocorrência do cachorro-do-mato e possível contato com animais domésticos da região.

Um estudo realizado em Minas Gerais encontrou *Dipylidium caninum*, um cestódeo comumente encontrado em cães e gatos domésticos, em intestino de um indivíduo da espécie, demonstrando possível contato com animais domésticos (VIEIRA *et al.*, 2012). Outro estudo detectou animais mantidos em zoológico sorologicamente positivos para *Leishmania* sp., importante patógeno de caráter

zoonótico, amplamente distribuído no mundo (JUSI *et al.*, 2011).

Sobre patógenos virais, foram detectados alguns vírus comumente encontrados em cães domésticos, como o Parvovírus canino (SPERA *et al.*, 2020) e o Astrovírus canino (Mamastovírus 5) em indivíduos de vida livre (ALVES *et al.*, 2018).

Em relação a estudos envolvendo a pesquisa bacteriana, foi relatado a presença de *Salmonella* spp., em animais cativos, evidenciando possível contaminação por fonte alimentar, seja por presa oferecida na dieta ou por animais que podem adentrar o recinto (LIMA *et al.*, 2012) e em um criadouro conservacionista foram encontrados: *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* sp., em dois animais sem sinais clínicos (GOMES *et al.*, 2011).

2.1.3 Raposa-do-campo

A raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) é endêmica do Brasil, ocorrendo no bioma Cerrado em áreas de transição do Pantanal. Esta espécie é bem adaptada em áreas com ação antropogênica e raramente é avistada em áreas de floresta densa e embora seja abundante na região, seu habitat vem sendo intensamente destruído pelo interesse em agricultura, portanto é classificada pela IUCN como “Near threatned”, ou seja, quase ameaçada (LEMOS *et al.*, 2020).

Trata-se de um animal onívoro, que tem os cupins como base de sua dieta, porém se alimentam de outros insetos, frutas e pequenos animais e ao contrário da percepção que se têm, aves domésticas são praticamente ausentes na dieta destes animais (LEMOS *et al.*, 2020). Além da perseguição humana para proteção de suas aves de criação, o ataque de cães domésticos e os atropelamentos também são responsáveis pela diminuição das populações naturais de raposa-do-campo (LEMOS *et al.*, 2020).

2.1.4 Cães domésticos

Derivados do lobo-cinzento (*Canis lupus*), os cães domésticos (*Canis lupus familiares*) que vivem em áreas rurais são classificados como animais mantidos por seus donos, mas não são confinados em suas habitações ou proibidos de acessar a área externa e suas atividades podem estimular o contato com os animais silvestres (VANAK & GOMPPER, 2009).

Esta interação pode ocorrer de diferentes formas e causar impactos negativos em populações silvestres, seja pela competição por alimento e área ou por serem potenciais reservatórios de patógenos (VANAK & GOMPPER, 2009).

Entre os patógenos compartilhados entre cães domésticos e os canídeos silvestres podemos destacar os vírus da raiva, cinomose, parvovirose canina, coronavírus canino, adenovírus canino e astrovírus canino (FURTADO *et al.*, 2016; WEBER *et al.*, 2020). Tais informações foram melhor evidenciadas em estudo do viroma de *Cerdocyon thous* e *Lycalopex gymnocercus*, vítimas de atropelamento no Rio Grande do Sul, Brasil e Uruguai, onde foi demonstrado amostras positivas para o vírus da cinomose em *C*. *thous*, parvovírus canino em ambas as espécies, bocavírus canino em *L*. *gymnocercus* (WEBER *et al.*, 2020) e em relato de um animal que apresentava sinais clínicos de cinomose em que a análise filogenética do vírus apresentou alta similaridade aos encontrados em cães domésticos (MEGID *et al.*, 2010). Também há relatos de prevalência de protozoários como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Leishmania chagasi* em ambas as espécies (ALMEIDA *et al.*, 2018).

No que se refere a bactérias, um estudo realizado com animais de vida livre no Rio Grande do Sul, detectou o gênero *Rickettsia* e *Bartonella* em pulgas que infestavam os indivíduos capturados, demonstrando uma exposição a microrganismos ainda não relatados (SCHOTT *et al.*, 2019).

Clostridium perfringens tipo A, um microrganismo comumente associado à microbiota de animais domésticos foi identificado em fezes de cachorro-do-mato, raposa-do-campo e lobo-guará, porém *Clostridium difficile*, foi encontrado apenas em animais que estavam sob o uso de antibióticos, sugerindo uma colonização importante nestas condições, indicando que esta espécie bacteriana possa ser importante causadora de quadros de diarreias em animais cativos, principalmente sob antibioticoterapia (SILVA *et al.*, 2014).

Em relação à composição da microbiota, muitos estudos são realizados em cães domésticos, em diferentes condições, principalmente pelo fato de ser o principal animal de companhia com contato muito próximo aos seus donos, podendo compartilhar microrganismos da microbiota (SONG *et al.*, 2013). Há evidências que a composição da microbiota foi sendo alterada durante o processo de domesticação de *Canis lupus* e atualmente tem diferentes funções nos cães domésticos e silvestres (LYU *et al.*, 2018).

2.2 Diversidade microbiana e patógenos em canídeos silvestres

A importância de se estudar a diversidade microbiana em tratos gastrointestinais deve-se ao fato de a microbiota possuir um grande papel na manutenção da saúde do hospedeiro, através da produção de vitaminas específicas, proteção contra patógenos, regulação de metabolismo, imunidade, entre outros (ZHANG *et al.*, 2014). Estudos em humanos reportam a relação da microbiota com inflamações crônicas, diabetes, alergias, obesidade e doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (HIERGEIST *et al*., 2015; AMBROSINI *et al*., 2019). Em mamíferos, a composição da microbiota é estabelecida durante o desenvolvimento, mas pode ser modulada por diversos fatores como a dieta, sexo, idade, condições corporais, entre outros (BYKOVA *et al.*, 2020; SCARSELLA *et al.*, 2020a; SCARSELLA *et al.*, 2020b; CHUN *et al.*, 2020).

De acordo com a busca de relatos na literatura, os estudos dos microrganismos que possam ameaçar as populações naturais de canídeos são escassos e limitados a poucos animais amostrados ou comparativos com animais mantidos sob cuidados humanos e serão mencionados a seguir.

A microbiota dos lobos-guará de cativeiro foi avaliada em estudo com vinte e quatro indivíduos mantidos em zoológicos no Estado de São Paulo, no qual foi detectado o gênero *Salmonella* sp. em seis animais e as espécies encontradas foram: *Escherichia coli* (96%), *Enterobacter* sp. (21%), *Proteus vulgaris* (8%), *Proteus mirabilis* (88%), *Providencia rettgeri* e *P*. *stuartii* (4% cada), *C*. *freundii* (54%), *Hafnia alvei* (4%) e *Alcaligenes faecalis* (8%). (GILIOLI & SILVA, 2000). Outro estudo direcionado para bactérias gastrintestinais no Reino Unido identificou *Campylobacter lari* e *Yesrsinia enterocolitica* em lobos-guará mantidos em zoológicos (STIRLING *et al.*, 2008).

Estudo realizado na Serra da Canastra, Minas Gerais, com amostras de dois lobos-guará silvestres e seis animais provenientes de instituições que mantêm animais sob cuidados humanos, demonstrou que o contato direto ou indireto com humanos ou seus subprodutos pode interferir no perfil de resistência das bactérias isoladas nesses animais (VIEIRA-DA-MOTTA *et al.*, 2013). Neste mesmo estudo foram encontrados na cavidade oral dos animais de vida livre: *E*. *coli*, *P*. *vulgaris*, *Staphylococcus* Coagulase Negativa e *Micrococcus* sp. e em animais de cativeiro:

todos acima e *S. intermedius*. (VIEIRA-DA-MOTTA *et al.*, 2013).

Em relação aos estudos realizados com amostras de cachorro-do-mato, fezes de dois indivíduos de um criadouro conservacionista em Palmas, Tocantins, detectou as espécies *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* sp. (GOMES *et al.*, 2011) e em amostras de *swabs* retais de nove indivíduos mantidos em um zoológico em Recife, PE detectou-se o gênero *Salmonella* em seis animais (LIMA, 2012).

Até o momento, não existem relatos de estudos envolvendo a microbiota de raposas-do-campo, provavelmente pelo fato de existirem somente 28 indivíduos mantidos sob cuidados humanos - Zoológico de Ribeirão preto (2), Zoológico de São Paulo (2), Zoológico de Americana (8), Zoológico de Brusque (2), Zoológico de Piracicaba (6) e Zoológico da Unisep (União de Ensino do Sudoeste do Paraná), em Dois vizinhos (6) (Dados não publicados).

Por outro lado, muitos trabalhos são realizados para analisar a microbiota dos cães domésticos. A grande quantidade de estudos envolvendo a microbiota de cães domésticos é, provavelmente, estimulada pelo contato direto com os humanos. Essa relação dos seres humanos com cães domésticos como animais de estimação promove o compartilhamento da diversidade de microrganismos presentes na pele, por exemplo, porém o mesmo não ocorre com a microbiota oral e intestinal (ELLIOTT *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2013; LEHTIMÄKI *et al.*, 2020).

O microbioma fecal de cães domésticos que apresentam alguma disfunção trato gastrointestinais é diferente do microbioma fecal de cães domésticos saudáveis (SUCHODOLSKI *et al.*, 2012) e a dieta demonstra ser um importante fator para a mudança da composição do microbioma fecal nestes animais (HANG et al, 2012). Animais com dieta composta por altos níveis de carboidrato, proteína ou se alimentam de ração seca comercial apresentam uma composição de microrganismos no trato gastrointestinal significantemente diferente (HANG et al, 2012).

2.3 Técnicas para identificação de microrganismos

Atualmente, existem várias ferramentas disponíveis para identificar os microrganismos que participam da microbiota humana e animal e cada técnica apresenta suas vantagens e desvantagens (GARCIA-MAZCORRO & MINAMOTO, 2013).

Tradicionalmente, a identificação de um microrganismo depende da promoção do crescimento em meios de cultura, seguidos de diferentes testes fenotípicos. Porém, com o avanço do conhecimento em Biologia Molecular, houve o desenvolvimento de diferentes técnicas (ABAYASEKARA *et al.*, 2017). Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, os estudos de metagenômica se tornaram populares. O princípio básico da metagenônica é analisar o DNA extraído diretamente da amostra de interesse e não dos isolados obtidos através de cultivos (HIERGEIST *et al*., 2015). Desta forma, essa abordagem permite obter uma grande quantidade de dados sobre a diversidade de microrganismos não cultiváveis, reforçando a informação de que somente 1% dos microrganismos seria cultivável, ou seja, 99% dos microrganismos existentes não poderiam ser acessados através de técnicas de cultivo (AMANN *et al* 1995; HORNG *et al.*, 2018). Com essas informações, houve a tendência de diminuir a aplicação das técnicas dependentes de cultivo para avaliação da diversidade de microrganismos. No entanto, verificou-se que a metagenômica também apresenta suas limitações, pois diferentes métodos de extração de DNA e regiões alvo estudadas, bem como uma baixa sensibilidade em detectar determinados gêneros bacterianos podem gerar um viés nos resultados (LAGIER *et al.*, 2015).

Estudos mais recentes demonstram que 70% dos microrganismos identificados por pirosequenciamento, técnica de sequenciamento gênico que já foi muito utilizada em projetos de metagenômica, poderiam ser cultivados utilizando uma combinação de meios de cultura variados e que o percentual de espécies não cultiváveis são inferiores a 99%, porém ainda estamos muito longe de cultivar a maioria desses microrganismos (GOODMAN *et al.*, 2011; GARCIA-MAZCORRO & MINAMOTO, 2013; MOLINA-MENOR, 2021).

Devido à grande discussão sobre a sensibilidade das técnicas dependentes de cultivo a abordagem através da culturômica tem sido testada e difundida em estudos recentes. A culturômica envolve o uso de meios de cultura com diferentes composições e condições de cultivo que, aliado a identificação através de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight), podem promover o acesso a novas espécies de microrganismos (LAGIER *et al.*, 2015). MALDI-TOF é uma técnica de espectrometria de massas que pode ser utilizada para a identificação de microganismos baseado na análise espécie-específica do espectro

de massas de peptídeos e proteínas (VAN VEEN *et al.*, 2010).

A combinação da culturômica com a técnica de MALDI-TOF tem sido aplicada em diversos estudos e, apesar de detectar uma diversidade inferior de táxons quando comparada a metagenômica, tem demonstrado que é possível acessar microrganismos não detectados através de metagenômica e, além disso, que somente 15% das espécies bacterianas são identificadas concomitantemente, quando são ambas as técnicas são realizadas em paralelo (PEREIRA *et al.*, 2020; PEREIRA &CUNHA, 2020). Diante disso, estudos recentes sugerem o uso de ambas as técnicas, que são complementares (FENSKE *et al.*, 2020)

2.4 Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado

Os esforços do PCMC ao longo dos últimos anos vêm gerando um material científico de grande valor para o entendimento da relação entre os animais silvestres e domésticos da região. Um levantamento de espécies de carrapatos encontrados nas mesmas espécies de animais amostrados e na mesma região estudada neste trabalho demonstra que espécies de carrapatos normalmente associadas a animais domésticos foram encontradas em animais silvestres enquanto cães domésticos estavam infestados com espécies de carrapatos típicos da fauna silvestre, demonstrando um possível fluxo de vetores entre os grupos de animais (RAMOS *et al.*, 2020).

Em outro estudo, com amostras obtidas dos mesmos animais deste projeto, foram detectadas infecções por *Trypanosoma cruzi* em raposa-do-campo, cachorro-do-mato e cão doméstico e por *Leishmania* spp. em cachorro-do-mato e lobo-guará, demonstrando que canídeos silvestres e domésticos estão infectados em uma mesma área (BRANDÃO *et al.*, 2020). Além disso, é relatado que a taxa de infecção em raposas-do-campo é duas vezes maior que em cachorro-do-mato, possivelmente devido às suas características ecológicas, sendo o único canídeo neotropical com uma dieta predominantemente insetívora e a única espécie entre as três a frequentemente utilizar as tocas de tatus, ambiente conhecido por manter alguns vetores na área estudada (ROCHA *et al.*, 2013).

Através dessas pesquisas realizadas pelo PCMC é possível elaborar protocolos para medidas de controle de transmissão de doenças de canídeos domésticos para os silvestres e cada uma delas possui suas vantagens e

desvantagens. A redução da incidência de doenças, tanto nas espécies consideradas reservatórios quanto nas espécies alvo; a redução da transmissão de doenças entre as espécies através de barreiras físicas são exemplos de estratégias que podem ser abordadas (LAURESSON *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a composição bacteriana em cavidade oral e retal de *Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus in situ* e de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*).

3.2 Objetivos específicos

- Através da parceria entre FPZSP e PCMC, obter amostras de *swabs* orais e retais das espécies silvestres mencionadas e cães domésticos da mesma região;
- Isolar e preservar microrganismos de cavidade oral e retal das espécies mencionadas, estabelecendo uma coleção de microrganismos;
- Descrever a diversidade bacteriana em amostras de canídeos silvestres *in situ* e cães domésticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O trabalho foi realizado em parceria com o PCMC, que desde 2009 direciona esforços para promover a conservação de canídeos e felídeos em Goiás e Minas Gerais, por meio de pesquisas *in situ* e colaborações com diversas instituições de pesquisa (Canids.org, 2021), tendo sido o estudo conduzido em áreas de fazenda de gado na região do Limoeiro, município de Cumari (18°15'S, 48°09'W), Estado de Goiás (Figura 1). Embora a área esteja em sua grande maioria coberta por pastagem (*Brachiaria* sp.), ainda existem fragmentos da vegetação inicial. A região é caracterizada por um clima dividido em duas estações bem definidas: quente e úmida de outubro a março e fria e seca de abril a setembro (SANO & ALMEIDA, 1998).

Figura 1 – Mapa da região do Município de Cumari (GOOGLE, 2021)

4.2 Animais amostrados

Os animais foram selecionados aleatoriamente durante os procedimentos de captura e são pertencentes às espécies: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e lobo-guara (*Chrysocyon brachyurus*). Também foram amostrados os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) que vivem

junto às famílias que habitam as fazendas de gado na região.

4.3 Captura dos animais

A captura dos animais foi realizada pelos pesquisadores do PCMC de acordo com os protocolos pré-estabelecidos, através de armadilhas do tipo box com iscas (frango cozido ou sardinha), distribuídas em pontos estrategicamente posicionados. Os locais de armadilhagem foram selecionados a partir da presença de vestígios, como rastros e fezes e de observações diretas das espécies alvo do estudo. As armadilhas eram checadas diariamente, pela manhã, e se houvesse algum animal capturado, o procedimento de anestesia era iniciado. Caso não houvesse nenhum animal, a isca era substituída, quando necessário.

Em caso de captura de algum indivíduo, prosseguia-se com o protocolo de anestesia, realizado por um Médico Veterinário, por meio de injeção intramuscular de uma associação de fármacos, conforme protocolo previamente estabelecido. O animal sedado era posicionado em uma mesa de procedimentos para início das coletas de amostras e, durante todo o período, o animal tinha todos os parâmetros vitais monitorado por um Médico Veterinário.

Os procedimentos de captura e manipulação dos animais seguiram as recomendações do guia de captura e manejo aprovado pelo Comitê da Sociedade Americana de Cuidado e Uso Animal de Mamíferos (SIKES & GANNON., 2011). Técnicas adequadas de biossegurança e equipamentos de proteção individual foram utilizados durante os procedimentos de coleta e manuseio das amostras biológicas. A captura e coleta de amostras biológicas dos carnívoros selvagens estão autorizadas pelo SISBIO sob a licença número 14576-4.

4.4 Amostragem de cães domésticos

É de conhecimento comum que nas fazendas de gado da região do Limoeiro, Cumari, Goiás, muitas famílias mantêm cães domésticos livres, com a finalidade de proteção e segurança. Estes animais têm o hábito de transitar livremente em toda a área de fazenda e de vegetação nativa. Diante disso, Biólogos e Médicos Veterinários do PCMC realizaram uma abordagem amistosa às famílias, explicando a origem e finalidade do projeto, bem como o papel da FPZSP e do PCMC na

região. A importância da manutenção da saúde dos animais domésticos para a conservação da fauna foi mencionada explicada aos moradores que, mediante a uma autorização por escrito, permitiram a realização das avaliações clínicas e coleta de amostras dos cães domésticos.

4.5 Coleta e acondicionamento de amostras

Com a colaboração dos pesquisadores do PCMC as amostras de cavidade oral e retal foram colhidas de todos os animais. Para a obtenção da amostra de cavidade oral, um *swab* foi introduzido na cavidade e friccionado pelas regiões: gengival, dental, mucosas laterais, palato, lingual e sublingual. Para a coleta de amostra retal, outro *swab* foi introduzido pela cavidade anal do animal e foi realizado movimento de rotação por 30 segundos. Ambos os *swabs* foram acondicionados em meio de transporte Stuart (ABSORVE, CRAL) e mantidos refrigerados de 2° a 8°C até o envio ao laboratório de campo.

4.6 Cultivo, isolamento e preservação dos microrganismos

O alojamento de pesquisadores do PCMC conta com uma sala exclusiva para o processamento das amostras, denominada de Laboratório de campo. Antes do início deste projeto, a sala foi adaptada e um projeto piloto foi realizado para o estabelecimento do protocolo de processamento das amostras microbiológicas. No Laboratório de campo, antes de iniciar o processamento das amostras, a sala era fechada e as bancadas eram limpas com etanol 70%. Neste momento só era permitida a permanência da pessoa responsável por processamento das amostras, devidamente paramentado com avental, luva de procedimentos e máscara.

Os *swabs* foram inoculados em diferentes meios de cultura com a finalidade de utilizar os meios mais adequados e capazes de promover o crescimento de uma ampla diversidade de bactérias como o *Tryptic Soy Agar* (TSA) e Agar Sangue de carneiro 5%. Para as amostras retais também foi utilizado o Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos (CLED). As amostras foram semeadas pela técnica de esgotamento por estrias para a obtenção de colônias puras (TORTORA *et al.*, 2012).

Para determinar a logística de envio de amostras para a FPZSP, testaram-se duas condições de incubação dos meios de cultura: a primeira, mantendo-se os

meios de cultura inoculados em geladeira e posteriormente incubados em estufa a 36°C +/- 2°C e a segunda, incubando os meios de cultura inoculados diretamente 36°C +/- 2°C. Como não houve diferença na diversidade de colônias bacterianas obtidas e houve o isolamento de bactérias fastidiosas na primeira situação, optou-se por esta condição. Desta forma, os meios de cultura confeccionados no Laboratório de Microbiologia da FPZSP eram enviados ao Laboratório de campo e mantidos em geladeira (2°C a 8°C) até o momento do processamento.

Os meios de cultura selecionados eram previamente retirados da geladeira, as amostras inoculadas e sequencialmente realizada a técnica de esgotamento por estrias, a fim de obter-se o isolamento de colônias. Posteriormente as placas inoculadas eram colocadas em geladeira para evitar-se a contaminação e enviadas ao Laboratório de Microbiologia da FPZSP, via transporte rodoviário em caixa de isopor, para dar continuidade ao processamento das amostras.

As placas, ao chegarem às dependências da Fundação, eram incubadas em estufa incubadora (QUIMIS, modelo Q316M4) a 35°C +/- 2°C por até 48 horas. Após a verificação do crescimento bacteriano, foram observadas as diferentes características morfológicas das colônias, que foram repicadas em novas placas contendo o meio TSA e incubadas a 35+/-2 °C, por 24 a 48 horas. Após o isolamento, foi realizada a caracterização morfológica de colônias, na qual aspectos físicos das colônias, como tamanho, superfície, pigmento, entre outros, foram registrados, com objetivo de garantir a confiabilidade na posterior reativação de cada isolado (Apêndice A).

Para identificação e composição de uma coleção de microrganismos, todos os isolados bacterianos obtidos foram preservados em triplicata por meio de ultracongelamento, utilizando-se o glicerol como crioprotetor para minimizar danos às estruturas celulares e garantir a viabilidade por mais tempo (QUINN *et al.*, 2005). Para isso, uma a duas colônias foram inoculadas em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubadas a 35+/- 2 °C sob agitação de 120 rpm, por 24 horas. Após o período de incubação, 0,5 mL do caldo foi adicionado a 0,5 mL de glicerol a 20% em criotubo estéril e o congelamento gradual foi realizado. Todos os isolados bacterianos estão mantidos na Coleção de Culturas de Microrganismos da FPZSP e o seu acesso registrado perante o Conselho de Gestão ao Patrimônio Genético (CGen), através do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o cadastro AB88CD4.

4.7 Identificação dos microrganismos

A técnica selecionada para a identificação das bactérias isoladas neste estudo foi espectrometria de massas, utilizando-se o equipamento MALDI-*Biotyper*® (*Bruker*®), pertencente à Universidade Federal de São Paulo, campus Diadema, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Monica Telles.

Em casos em que não foi possível a identificação em nível de gênero e o isolado apresentou algum potencial biotecnológico, a ser abordado posteriormente, foi realizada a identificação utilizando o sequenciamento gênico, que será descrita a seguir.

4.7.1 *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight* (MALDI-TOF)

Para a identificação bacteriana utilizando a técnica de MALDI-TOF, os isolados criopreservados foram reativados através da inoculação em meio TSA e utilizando-se a cultura fresca e recente (com crescimento até 24 horas), procedeu-se com a metodologia descrita por VAN VEEN *et al*., 2010.

Desta forma, foram testadas em triplicata todas as culturas bacterianas, incluindo as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizada para calibração e controle e de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizada como controle. As cepas padrões foram aplicadas em todas as leituras e em diferentes pontos da placa com o intuito de verificar se a aquisição do espectro das moléculas era uniforme em toda a placa, além de validar os resultados através de espécies conhecidas.

Inicialmente, utilizou-se a metodologia de leitura direta, na qual uma porção da colônia foi diretamente depositada na placa de leitura do equipamento e quando não foi possível a identificação através da metodologia direta, os isolados foram submetidos ao pré-tratamento e testados novamente. O pré-tratamento consistia em ressuspender uma colônia do isolado a ser testado em 300 µL de água destilada, adicionar 900 µL de etanol absoluto e centrifugar (14.000g x 2 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e aguardava-se a secagem completa do sedimento. 25 µL de ácido fórmico (70% e 25 µL de acetonitrila eram adicionados ao sedimento, homogeneizado e a solução era submetida a centrifugação

novamente (14.000 g x 2 minutos). Um volume de 1 µL do sobrenadante era aplicado na placa de leitura do equipamento. Em ambas as metodologias, após serem aplicadas na placa em triplicada, foi adicionado 1 µL de matriz ionizante (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich, catálogo #39468), ressuspendida em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (VAN VEEN *et al*., 2010).

Os espectros gerados foram obtidos utilizando-se o software *FlexControl* 3.4 e analisados através do software *Realtime Classification*. De acordo com o preconizado pela técnica, isolados classificados com escore acima de 1.700 são considerados como provável gênero, acima de 2.000, como provável espécie e acima de 2.300, como espécie confiável. As leituras com o escore abaixo de 1.700 não geram resultados de identificação.

4.7.2 Extração do DNA Genômico

Após a identificação através de MALDI-TOF, os isolados selecionados para as análises moleculares foram submetidos a extração do DNA genômico utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit*®, catálogo número #A1120, *Promega*®, seguindo as recomendações do fabricante. A integridade e a concentração do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro *NanoVue Plus*® (*GE HealthCare*®).

4.7.3 Amplificação dos fragmentos de 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada através de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) com o uso dos iniciadores 27F (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3´) e 1401R (5´ CGGTGTGTACAAGACCC 3´) (LANE, 1991) para a obtenção de sequências das regiões V1 a V9 deste gene. Foram adicionados à reação: 1X de tampão da enzima, que continha 20mM de Tris-HCl, pH 8,4 e 50mM de KCl; 1,5 mM de $MgCl_2$; 200µM de dNTP´s; 30-50 ng de DNA genômico; 0,2 µM de *primers*, 2U de Taq polimerase (*Invitrogen*) e água para ajustar o volume final da reação. A reação de PCR foi realizada em termociclador *Veriti*™ *96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*®) na seguinte configuração: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Ao fim dos 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por

10 minutos.

4.7.4 Purificação dos fragmentos de PCR

Para a purificação dos produtos da PCR utilizou-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (*Cytiva*™), e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.5 Sequenciamento do gene 16S rRNA

A reação para o sequenciamento gênico foi preparada utilizando-se 20-30 ng/µL do produto purificado para cada primer a 5 µM. Os *primers* utilizados foram os mesmos descritos na PCR e adicionalmente o 782R (5'ACAGGGTATCTAATCCTGT 3'). O sequenciamento foi realizado através da contratação dos serviços do Centro de Estudos do Genoma Humanos e Células Tronco, USP, em equipamento ABI 3730 *DNA Analyser (Applied Biosystems,* Massachusetts, EUA*)*, utilizando o kit *BigDye Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing* e os resultados recebidos em formato ABI.

4.7.6 Análises de Bioinformática

As sequências de DNA do gene amplificado obtidas através de sequenciamento gênico foram analisadas utilizando-se o software *ChormasPro* 2.1.10 (*Technelysium Pty* Ltda©). A qualidade das sequências foi verificada e as sequências foram alinhadas para a montagem das sequências consenso.

As sequências consenso obtidas foram submetidas a análise através da ferramenta on-line *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®) para a orientação e um melhor direcionamento das análises filogenéticas.

O resultado da análise com BLAST® apresentou o gênero com uma maior proximidade filogenética com os isolados analisados. Diante disso, foi realizado levantamento de todas as espécies pertencentes a este gêneroutilizando-se o banco de dados da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatur*e (LPSN) (PARTE *et al.*, 2020). A seleção das espécies a serem incluídas na análise levou em consideração: (1) a validação da nomenclatura perante o *International Code of*

Nomenclature of Prokaryotes (ICNP), (2) espécies descritas e publicadas recentemente que ainda não haviam sido validadas pelo ICNP, (3) disponibilidade de sequências do gene a ser analisado em bancos de dados e (4) limite mínimo estipulado de nucleotídeos das sequências obtidas. A espécie *Staphylococcus aureus* foi selecionada como *outgroup*, por se tratar de um táxon filogeneticamente distante. As análises, que foram divididas três etapas: a primeira, referente à análise inicial com todas as espécies e as segunda e terceira etapas com espécies selecionadas a partir de um valor de corte estipulado. As sequências de 16S rRNA de cada espécie foram obtidas a partir de sequências depositadas no GenBank®.

Para as análises filogenéticas, todas as sequências obtidas das espécies do gênero selecionado participaram da análise. Após a seleção e obtenção de sequências nucleotídicas das espécies a serem avaliadas em formato FASTA, o material obtido foi analisado através do *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGAX 10.2.6). O método *ClustalW* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi utilizado para o alinhamento múltiplo entre as sequências das amostras, das espécies pertencentes ao gênero com melhor resultado no BLAST® e do *outgroup*.

Para a inferência filogenética, o software MEGAX 10.2.6 foi utilizado para todas as análises. A matriz de distância foi construída, a partir dos dados do alinhamento múltiplo, utilizando-se a distância *p* como modelo de substituição.

Para a construção das árvores filogenéticas, utilizou-se o método de *Neighbour-joining*, a distância *p* como modelo de substituição e *bootstrap* com 1000 réplicas como teste de confiança.

Posteriormente, foram considerados os resultados da matriz de similaridade para o estabelecimento de valores de cortes para a seleção de espécies e as topologias de árvores foram geradas utilizando três métodos diferentes: Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e *Neighbour-joining*. O modelo de substituição para os métodos de Máxima Verossimilhança e *Neighbour-joining* foram Kimura-2-parâmetros e distância *p*, respectivamente e o teste de confiança utilizado para todos os métodos foi *bootstrap* com 1000 réplicas.

4.7.10 Análise de Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Os genes constitutivos (*housekeeping*) foram escolhidos com base na revisão da literatura, sendo amplamente utilizado para inferências filogenéticas do gênero

Pseudomonas. Os genes *rpo*B, *rpo*D, *gyr*B foram amplificados utilizando-se primers descritos previamente (Tabela 1).

A amplificação dos genes *rpo*B e *rpo*D foi realizada através de PCR, onde cada reação continha: 1X de *GoTaq®Green Master Mix* (*Promega Corporation*), 0,4µM dos *primers foward* e *reverse*, 50ng de DNA e água para ajustar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems®*) na seguinte configuração: desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C e 61°C para *rpo*B e *rpo*D, respectivamente, por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72° por 5 minutos.

Para a amplificação do gene *gyr*B foram utilizados para cada reação: 1,5 mM de $MgCl_2$, 1µM dos *primers foward* e *reverse*, 1X do tampão da enzima (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 2U de Taq polimerase (*Invitrogen*), 0,2 mM de dNTPs (cada), 50ng de DNA e água para ajustar o volume da reação. A configuração da reação em termociclador foi: desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72° por 5 minutos.

Tabela 1 - Primers utilizados para MLSA

Primer	Sequência (5' - 3')	Gene	Tamanho	Referência
LAPS5	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT	*rpo*B	1229pb	Tayeb *et al.*, 2005
LAPS27	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG			
PsEG30F	ATYGAAATCGCCAARCG	*rpo*D	760pb	Mullet *et al.*, 2009
PsEG790R	CGGTTGATKTCCTTGA			
UP1E	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSN GGNGGNARTTYRA	*gyr*B	966pb	Yamamoto *et al.*, 2000
APrU	TGTAAACGACGGCCAGTGCNGG RTCYTTYTCYTGRCA			

As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% e posteriormente corada com brometo de etídio para a verificação do tamanho dos fragmentos através da visualização em transiluminador (Loccus®) por luz UV.

Após a visualização dos fragmentos de DNA amplificados, foi realizada a

purificação a partir do produto da reação de PCR ou do fragmento extraído diretamente do gel de agarose, nos casos em que houve a visualização de bandas inespecíficas. O kit utilizado foi o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (*Cytiva*™), e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

A reação para o sequenciamento gênico foi preparada utilizando de 20 - 30ng/µL do produto purificado para cada primer a 5µM. O sequenciamento foi realizado através da contratação de serviços, em equipamento *ABI 3730 DNA Analyser*, utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e os dados de sequência recebidos em formato ABI.

As sequências de cada gene foram obtidas a partir de sequências depositadas no GenBank® e a edição e montagem das sequências consenso foi realizada conforme descrito no item 3.7.6 e o alinhamento de acordo com o item 3.7.9, separadamente para cada gene. Após o alinhamento múltiplo, as sequências dos genes 16S rRNA, previamente analisado, e dos genes *housekeeping rpo*B, *rpo*D e *gyr*B foram concatenados para análise de MLSA.

4.8 Testes fenotípicos

Para complementar as informações obtidas nos testes moleculares, foi realizada a caracterização fenotípica através de testes bioquímicos para cada isolado analisado. Utilizou-se o kit API 20NE® (BioMérieux®) de acordo com as instruções do fabricante, para avaliar diferenças fenotípicas que possam auxiliar na caracterização dos isolados. Como controle da reação, uma cepa padrão também foi analisada.

4.9 Compilação e análise dos dados

Utilizando-se o software RStudio, versão 1.3.1093 (RSTUDIO, 2020) foi elaborado um *script*, no qual foi realizado o cálculo da composição e frequência de gêneros, família e filo bacterianos por amostra e por hospedeiro e, posteriormente foram construídos os gráficos de barras. Os dados utilizados foram previamente tratados, garantindo-se que isolados bacterianos não identificados, com baixa confiabilidade na identificação não fossem considerados.

Para a visualização de sobreposição de resultados entre os animais estudados, construiu-se um diagrama de *Venn* por tipo de amostra, utilizando a ferramenta *on-line InteractiVenn*, descrita por Heberle, *et al.* (2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das amostras

Ao todo 177 coletas foram realizadas, de forma aleatória, de acordo com a captura diária dos animais e respeitando o protocolo estabelecido pelo PCMC. Foram realizadas 65 coletas em cachorros-do-mato, 11 em lobos-guará, 30 em raposas-do-campo e 71 em cães domésticos.

5.2 Estabelecimento de protocolo para o processamento das amostras

A execução de um projeto piloto para o estabelecimento da metodologia a ser utilizada neste projeto demonstrou grande importância para o sucesso no isolamento da diversidade de bactérias cultiváveis presente nas amostras. Nesta etapa, observou-se o crescimento de *Proteus* sp., microrganismo móvel, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, amplamente distribuído no ambiente. Este gênero bacteriano é encontrado no trato gastrointestinal de humanos e animais e possui a habilidade de alongar-se, secretando polissacarídeos, processo que é denominado formação de véu, o que lhe confere boa aderência e motilidade (JAMIL *et al.*, 2020). Devido a essa característica do gênero *Proteus*, quando isolado em meios de cultura convencionais, suas colônias podem encobrir as colônias de outras espécies presentes na amostra, impossibilitando o isolamento de diferentes espécies.

Portanto, a escolha de um meio de cultura que inibisse essa atividade de *Proteus* sp., como o CLED, foi essencial. Este meio de cultura, que é comumente utilizado na rotina de urocultura em laboratórios de análises clínicas humanas, além de promover o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, possui uma baixa concentração de íons, o que impede a formação do véu de *Proteus* sp., permitindo assim, um aumento na diversidade bacteriana isolada.

A utilização do meio de cultura Agar Sangue de Carneiro a 5% possibilitou a obtenção de uma diversidade de morfotipos bacterianos de maneira eficaz,

permitindo o isolamento de espécies fastidiosas como as bactérias da família *Neisseriaceae*, por exemplo.

A partir dessa ação conjunta entre FPZSP e PCMC, foi estabelecida uma coleção de microrganismos totalizando 1535 isolados bacterianos, sendo divididos em: cachorro-do-mato (537), lobo-guará (66), raposa-do-campo (341) e cão doméstico (591). Esta coleção será mantida pela FPZSP e poderá ser disponibilizada para novos estudos com potencial de aplicação em diversas áreas da ciência.

Considerando o número de amostras obtidas e analisadas, foi possível obter dados robustos para a descrição da diversidade de bactérias cultiváveis nestes animais, porém devido a fatores inerentes a metodologia de amostragem adotada, na qual a captura dos animais dependia em atraí-los através de iscas, o número de amostras para cada espécie animal apresentou grande diferença. Desta forma, a comparação dos resultados entre espécies não é adequada e os resultados serão apresentados de forma descritiva, as diferenças e semelhanças serão discutidas, levando-se em consideração esta limitação apontada.

5.3 Microrganismos identificados

Neste trabalho, utilizamos meio de cultura rico e não seletivo e uma cuidadosa seleção de diferentes morfotipos bacterianos, na tentativa de isolar uma diversidade de bactérias cultiváveis representativas, associando a identificação bacteriana à técnica de espectrometria de massas. Esta técnica vem sendo muito difundida, pois além de possibilitar a diminuição do custo e tempo gasto na identificação bacteriana, diversos trabalhos demonstram uma alta porcentagem de identificação correta de gênero e espécies bacterianos, entretanto, a falta de informações sobre espécies incomuns nos bancos de dados ainda é uma limitação da técnica (LAGIER *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2021).

Entretanto, o desafio das técnicas dependentes de cultivo está em promover as condições nutricionais e ambientais ideais para determinada população e, embora o uso metagenômica para estudos envolvendo microbiota seja o mais indicado atualmente, as técnicas tradicionais dependentes de cultivo têm sido aprimoradas através da culturômica.

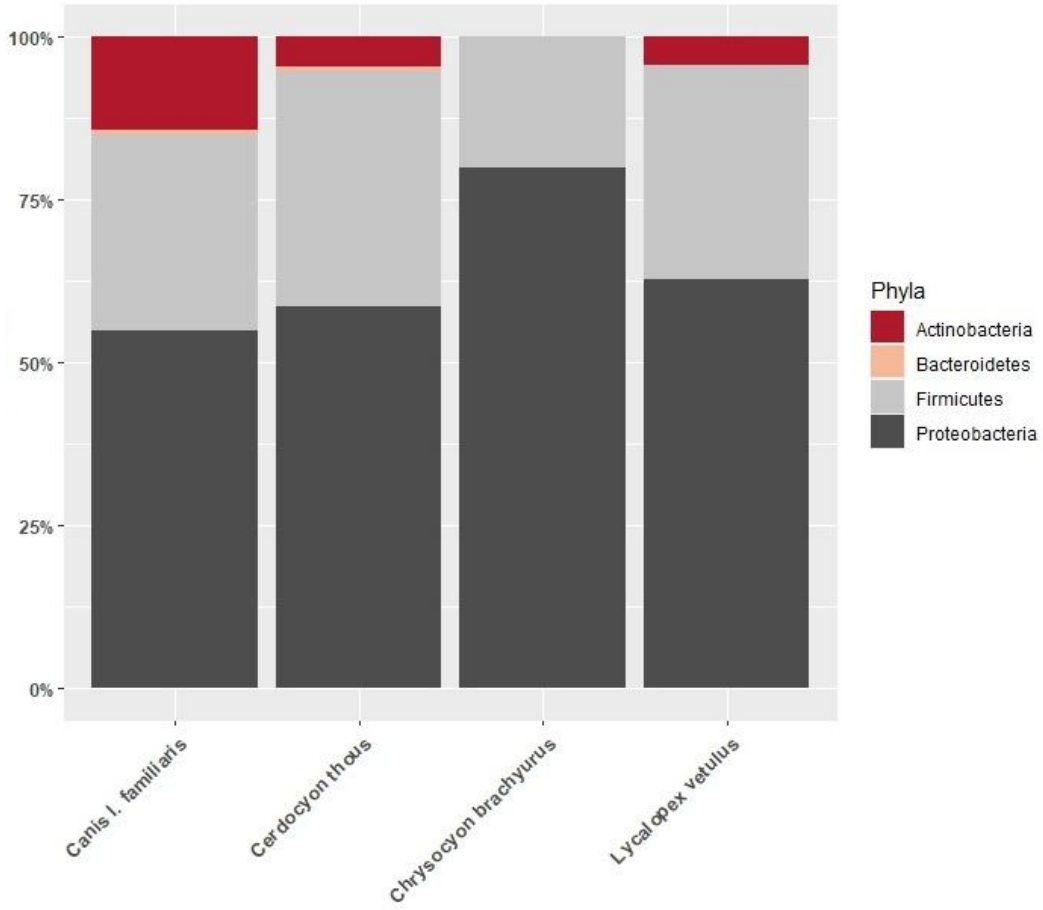
Considerando a discussão da aplicação de diferentes abordagens, ressalta-se

que os resultados aqui apresentados descrevem parte da microbiota dos animais, limitando-se aos microrganismos acessados através de técnicas de cultivo. Portanto, uma discussão sobre função e participação destes isolados em parâmetros fisiológicos dos animais não é adequada. Os resultados das identificações bacterianas foram analisados para o cálculo da prevalência, que será utilizado para demonstrar os táxons bacterianos cultiváveis encontrados no presente trabalho.

5.3.1 Cavidade oral

Os Filos bacterianos mais encontrados na cavidade oral de todos os animais foram *Proteobacteria* e *Firmicutes*, seguidos por *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, exceto em lobo-guará que não foram encontradas bactérias pertencentes aos dois últimos filos citados (Figura 2).

Figura 2 - Prevalência dos filos encontrados em cavidade oral

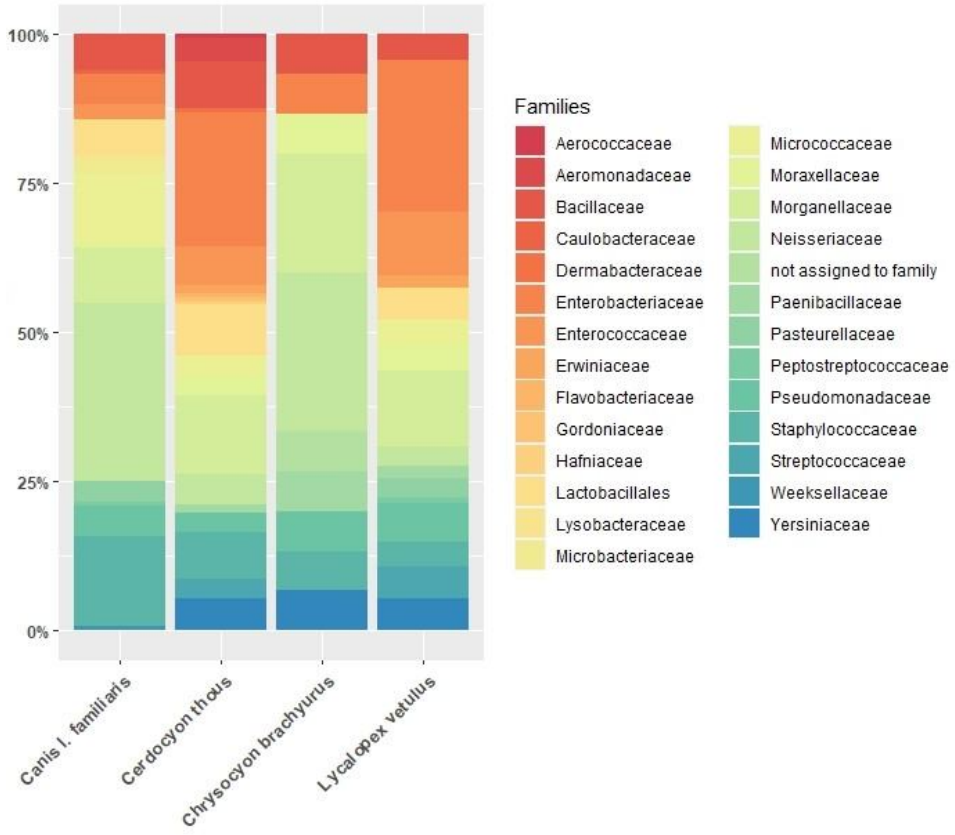


Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

Este resultado não representa necessariamente a ausência destes filos em lobos-guará e pode ser explicado pelo menor número de coleta de amostras desta espécie em relação às demais. O filo *Actinobacteria* possui baixa prevalência nas amostras de todos os animais (Apêndice B). Em estudos com humanos a baixa prevalência de espécies deste filo está relacionada com um bom desempenho cognitivo enquanto uma alta prevalência é encontrada em pessoas com a doença de Alzheimer (KUBINYI *et al.*, 2020).

Em relação às Famílias bacterianas encontradas em cavidade oral, destaca-se a prevalência de *Neisseriaceae* (30%) e *Staphylococcaceae* (15%) em cão doméstico; *Neisseriaceae* (27%) e *Morganellaceae* (20%) em lobo-guará (Apêndice C). Enquanto em cachorro-do-mato e raposa-do-campo foi detectada *Enterobacteriaceae* (22% e 26%, respectivamente) e *Morganellaceae* (13% em ambos) (Figura 3).

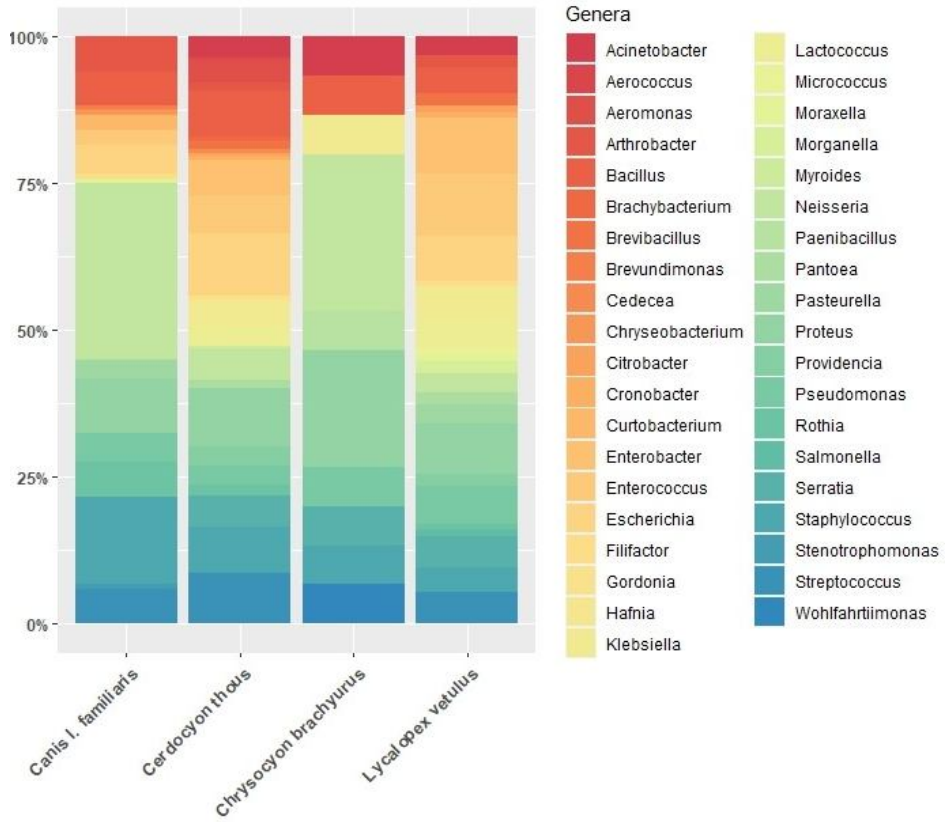
Figura 3 - Prevalência das famílias encontradas em cavidade oral



Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

A prevalência dos gêneros bacterianos é apresentada na Tabela 2. Entre os gêneros bacterianos em amostras de cavidade oral, cinco foram encontrados em todas as espécies (*Neisseria*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*), sete gêneros foram detectados somente em amostras de cachorro-do-mato e raposa-do-campo (*Enterobacter*, *Lactococcus*, *Providencia*, *Brevibacillus*, *Pantoea*, *Citrobacter* e *Cronobacter*), três gêneros em amostras de cão doméstico e raposa-do-campo (*Pasteurella*, *Filifactor* e *Moraxella*), três gêneros somente em animais silvestres (*Serratia*, *Klebsiella* e *Acinetobacter*), quatro gêneros apenas em cão doméstico (*Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*), sete gêneros em cachorro-do-mato (*Aeromonas*, *Aerococcus*, *Brachybacterium*, *Cedecea*, *Gordonia*, *Hafnia* e *Myroides*), dois gêneros somente em lobo-guará (*Paenibacillus* e *Wohlfahrtiimonas*) e três gêneros apenas em raposa-do-campo (*Morganella*, *Micrococcus* e *Salmonella*). (Figuras 4 e 8).

Figura 4 - Prevalência de gêneros encontrados em cavidade oral

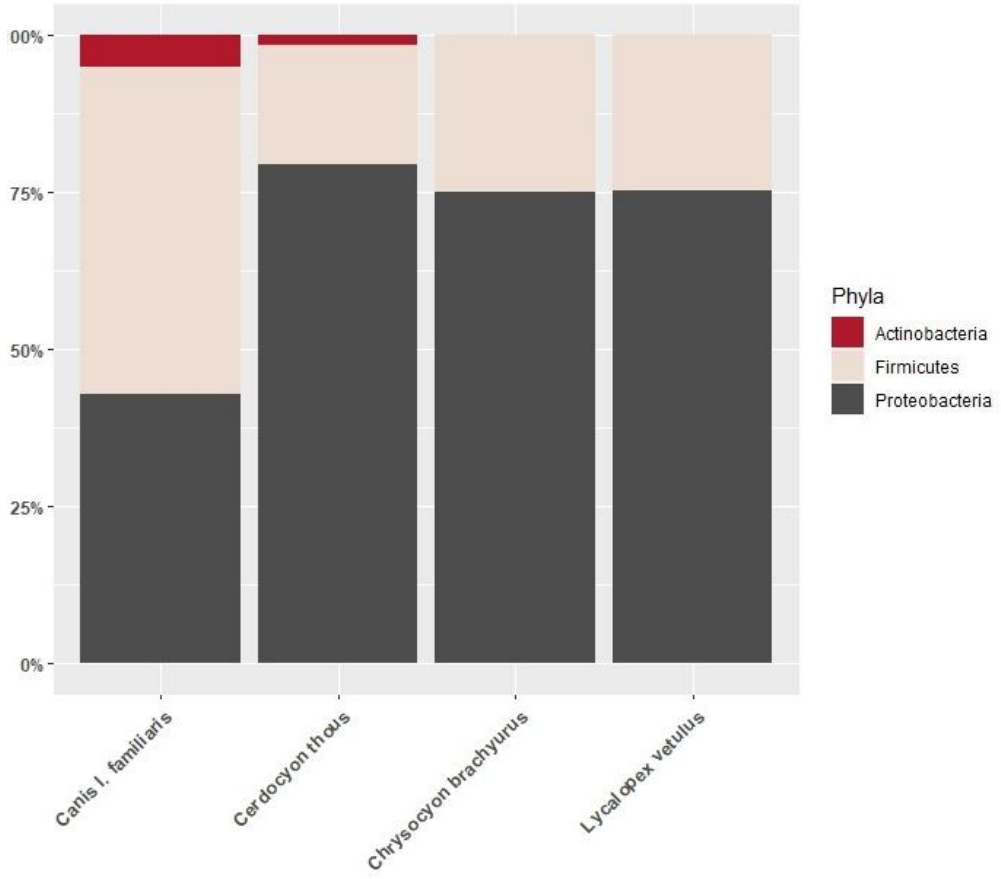


Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

5.3.2 Amostras retais

Nesta classificação é possível observar uma diferença na distribuição dos filos bacterianos encontrados em animais silvestres e domésticos. Os filos bacterianos mais encontrados em canídeos silvestres foram Proteobacteria e Firmicutes, seguidos por Actinobacteria e em cães domésticos foram Firmicutes e Proteobacteria, seguido por Actinobacteria (Figura 5). O resultado encontrado para cães domésticos está em concordância com os estudos previamente realizados, que demonstram um predomínio do Filo Firmicutes utilizando técnicas de metagenômica, podendo indicar uma boa aplicação da metodologia de cultivo para a promoção do crescimento bacteriano utilizada neste trabalho (CHUN *et al.*, 2020; KUBINYI *et al.*, 2020; SANDRI *et al.*, 2020).

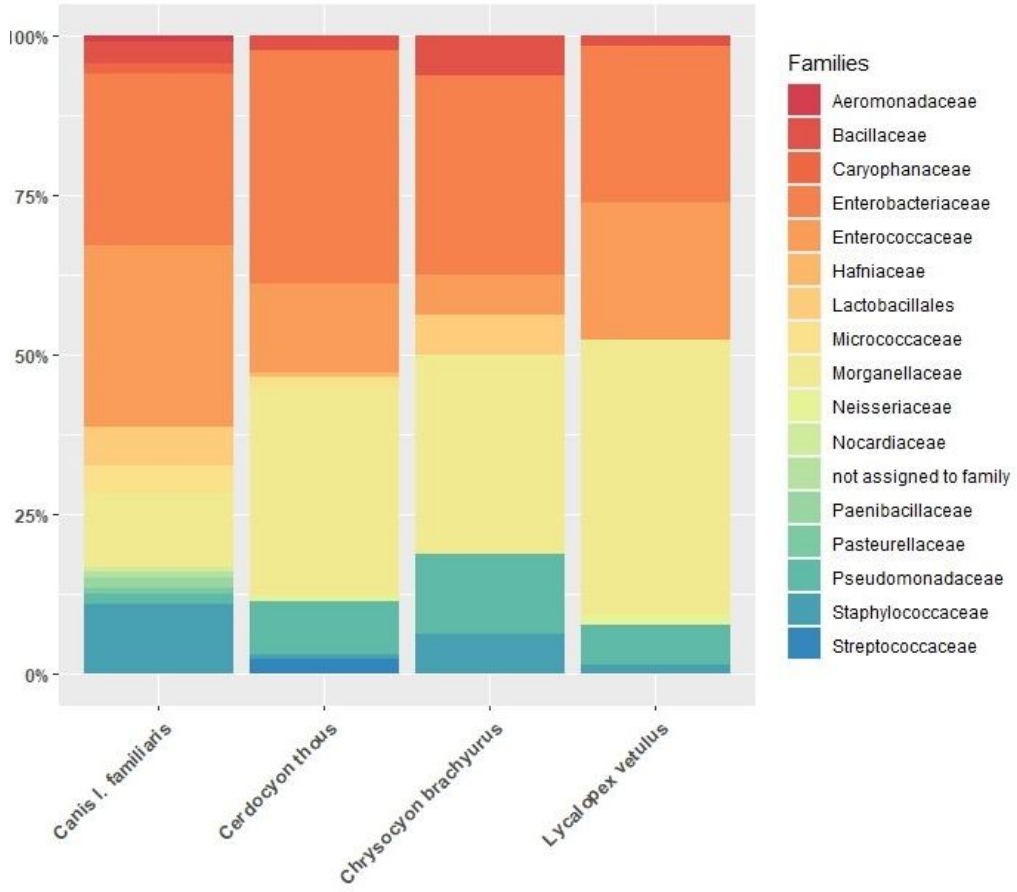
Figura 5 - Prevalência por Filo em amostra retal



Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

Em *swab* retal, as famílias Enterobacteriaceae, Morganellaceae apresentaram alta prevalência em todos os animais silvestres. Em cães domésticos a família Enterococcaceae apresentou maior prevalência (Figura 6).

Figura 6 - Prevalência por Família em amostra retal

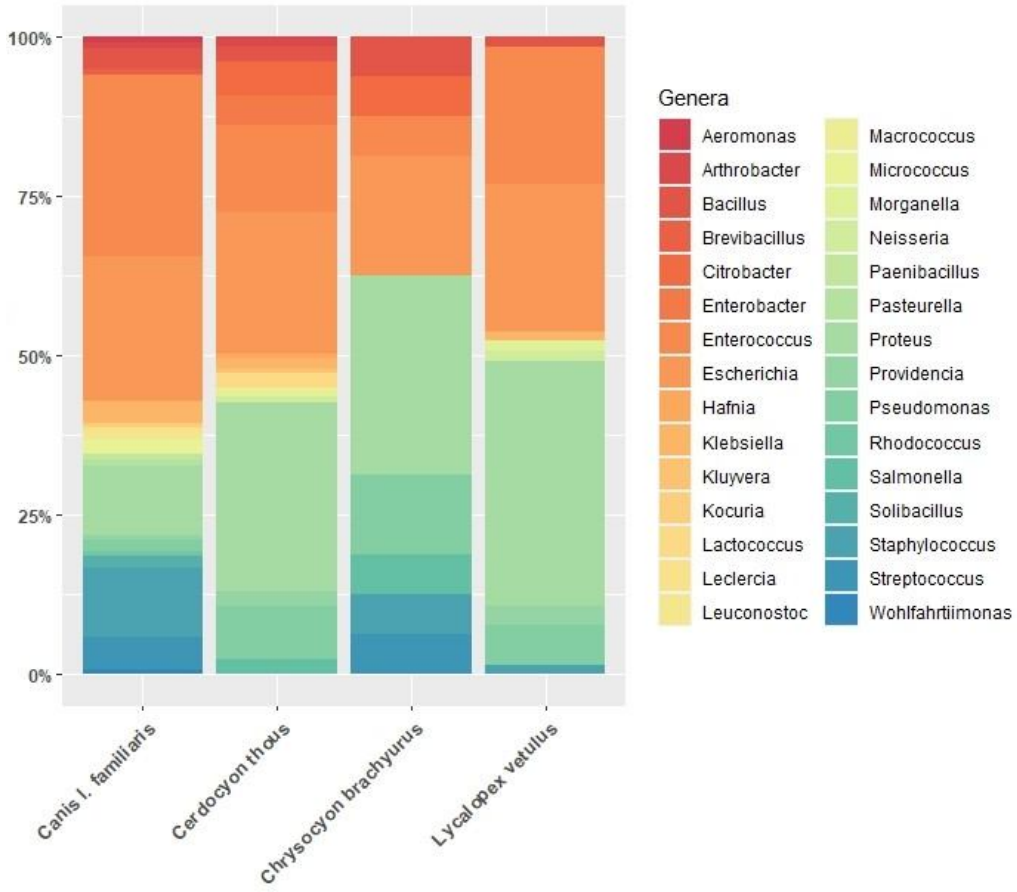


Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

Cinco gêneros bacterianos aparecem em todos os animais (*Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*), dois gêneros somente em cachorro-do-mato e raposa-do-campo (*Morganella* e *Neisseria*), dois gêneros apenas em cachorro-do-mato e lobo-guará (*Citrobacter* e *Salmonella*), onze gêneros em cão doméstico (*Micrococcus*, *Solibacillus*, *Aeromonas*, *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Leclercia*, *Leuconostoc*, *Paenibacillus*, *Pasteurella*, *Rhodococcus* e *Wohlfahrtiimonas*) e cinco gêneros em cachorro-do-mato (*Enterobacter*, *Lactococcus*, *Hafnia*, *Kluyvera* e

Macrococcus). A prevalência dos gêneros por amostras é apresentada na Tabela 2 e Figura 7.

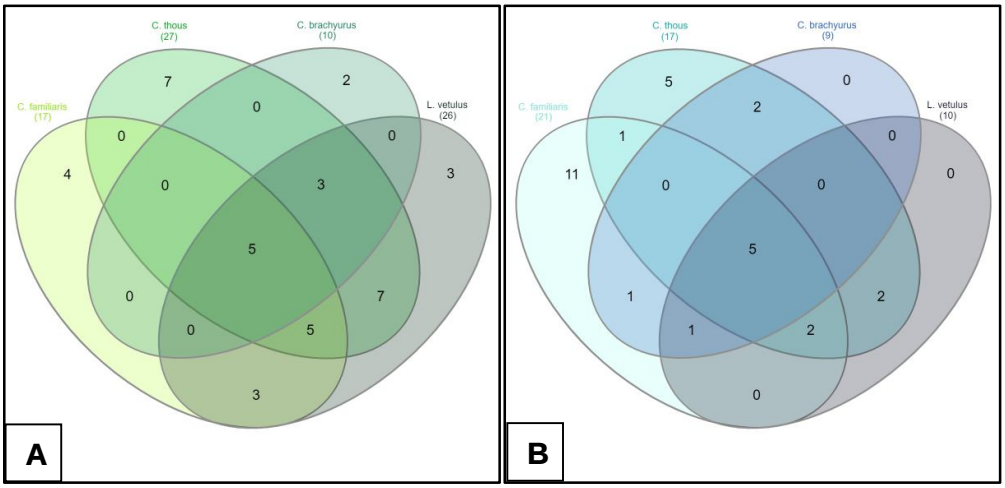
Figura 7 - Prevalência por gênero em amostra retal



Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

A classificação dos resultados por gênero bacteriano, permite observar a quantidade de gêneros compartilhados entre as espécies e a quantidade de gêneros isolados exclusivamente em cada espécie animal (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama de Venn para gêneros em cavidade oral (A) e retal (B)



Canis l. familiaris (cão doméstico), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo).

Considerando a ocorrência dos gêneros obtidos em ambas as amostras, podemos destacar que três gêneros foram encontrados em todas as amostras (*Bacillus*, *Proteus* e *Pseudomonas*), nove gêneros encontrados em cão doméstico e oito em cachorro-do-mato.

Tabela 2 - Prevalência de gêneros bacterianos por tipo de amostra

(continua)

	Oral (%)				**Retal (%)**			
Gênero	**CD**	**CM**	**LG**	**RC**	**CD**	**CM**	**LG**	**RC**
Acinetobacter		3,3	6,7	3,2				
Aerococcus		0,7						
Aeromonas		3,9			0,8			
Arthrobacter	5,8	1,3		2,1	0,8	1,5		
Bacillus	5,8	7,9	6,7	4,3	3,4	2,3	6,3	1,5
Brachybacterium		0,7						
Brevibacillus		1,3		2,1	0,8			
Brevundimonas	0,8							
Cedecea		0,7						
Chryseobacterium	0,8							
Citrobacter		0,7		1,1		5,3	6,3	
Cronobacter		0,7		1,1				
Curtobacterium	2,5							
Enterobacter		5,9		9,6		4,6		
Enterococcus	2,5	6,6		10,6	28,6	13,7	6,3	21,5

Tabela 2 - Prevalência de gêneros bacterianos por tipo de amostra

(conclusão)

	Oral (%)				Retal (%)			
Gênero	**CD**	**CM**	**LG**	**RC**	**CD**	**CM**	**LG**	**RC**
Escherichia	5	10,5		7,4	22,7	22,1	18,8	23,1
Filifactor	0,8			1,1				
Gordonia		0,7						
Hafnia		0,7				0,8		
Klebsiella		3,9	6,7	5,3	3,4	1,5		1,5
Kluyvera						0,8		
Kocuria					0,8			
Lactococcus		3,3		5,3		2,3		
Leclercia					0,8			
Leuconostoc					0,8			
Macrococcus						0,8		
Micrococcus				1,1	2,5			
Moraxella	0,8			1,1				
Morganella				2,1		0,8		1,5
Myroides		0,7						
Neisseria	30	5,3	26,7	3,2		0,8		1,5
Paenibacillus			6,7		0,8			
Pantoea		1,3		2,1				
Pasteurella	3,3			3,2	0,8			
Proteus	9,2	9,9	20	8,5	10,9	29,8	31,3	38,5
Providencia		3,3		2,1	0,8	2,3		3,1
Pseudomonas	5	3,3	6,7	6,4	1,7	8,4	12,5	6,2
Rhodococcus					0,8			
Rothia	5,8	2		1,1				
Salmonella				1,1		2,3	6,3	
Serratia		5,3	6,7	5,3				
Solibacillus					1,7			
Staphylococcus	15	7,9	6,7	4,3	10,9		6,3	1,5
Stenotrophomonas	0,8							
Streptococcus	5,8	8,6		5,3	5		6,3	
Wohlfahrtiimonas			6,7		0,8			

CD - cão doméstico, CM - cachorro-do-mato, LG - lobo-guará e RC - raposa-do-campo.

5.4 Diversidade bacteriana

Como apresentado anteriormente, devido à limitação da metodologia não é possível comparar os resultados entre as espécies, porém os resultados alcançados nos permitem realizar alguns apontamentos. Dados relacionados à microbiota dos animais silvestres aqui estudados são escassos ou inexistentes, principalmente quando se trata de animais de vida livre, e serão discutidos a seguir.

Em relação aos animais silvestres, poucos estudos relacionados a microbiota de lobo-guará e cachorro-do-mato foram realizados, alguns deles limitados aos animais de cativeiro. Não foram encontrados estudos envolvendo a diversidade bacteriana em amostras de raposas-do-campo e até o momento este é o único trabalho relacionado à microbiota desta espécie.

Os resultados referentes aos gêneros bacterianos identificados em lobo-guará estão em concordância com estudos anteriores, onde foram encontradas as espécies *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Micrococcus* sp. em amostras de cavidade oral e *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia* marcescens e *Staphylococcus* coagulase negativa em região perianal isolados de dois indivíduos silvestres (VIEIRA-DA-MOTTA, 2013).

Os isolados *Enterobacter* sp*., Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* sp., foram isolados previamente em cachorros-do-mato em estudo realizado com dois animais de cativeiro (GOMES *et al.*, 2011). Neste estudo, o gênero *Salmonella* foi isolado em poucos indivíduos pertencentes às espécies silvestres: amostras retais de três cachorro-do-mato e um lobo-guará e cavidade oral de uma raposa-do-campo. Este gênero já foi identificado anteriormente em amostra retal de seis cachorros-do-mato mantidos em cativeiro (LIMA, 2012). Apesar de ser um potencial causador de distúrbios gastrintestinais em mamíferos, relatos de lobos-guará que abrigam *Salmonella* sem quadro de diarréia sugerem que esta seja uma associação não patogênica para espécie (GILIOLI & SILVA, 2000).

Staphylococcus, encontrado em todas as espécies com maior prevalência em cavidade oral de cão doméstico e cachorro-do-mato, foi descrita em amostra otológica de cachorro-do-mato em cativeiro (LIMA, *et al.*, 2012).

Em cachorro-do-mato e raposa-do-campo não houve uma prevalência acentuada de algum gênero em amostras de cavidade oral, sendo os gêneros mais representativos: *Escherichia*, *Proteus* e *Streptococcus* em cachorro-do-mato e

Enterococcus, *Enterobacter* e *Proteus* em raposa-do-campo. Ao visualizarmos os resultados de prevalência de gêneros bacterianos podemos perceber uma semelhança no perfil de bactérias identificadas em cavidades orais e retais de cachorros-do-mato de raposas-do-campo. O fato de possuírem uma dieta similar e habitarem uma mesma região pode explicar essa similaridade.

Em cães domésticos, foram encontrados gêneros bacterianos que não são comumente relacionadas à microbiota de cães domésticos. Embora haja discrepância de informações, relata-se que os gêneros mais encontrados em fezes destes animais são: *Lactobacillos*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium* (GARCIA-MAZCORRO & MINAMOTO, 2013). Por outro lado, relata-se que cães domésticos podem atuar como reservatório de *Yersinia enterocolitica* e *Y*. *pseudotuberculosis*, considerados patógenos causadores de importantes doenças intestinais zoonóticas (WANG *et al.*, 2014), porém neste estudo, essas espécies não foram isoladas.

Os resultados das inúmeras pesquisas relacionadas à microbiota de cães domésticos apresentam muitas contradições, dificultando o entendimento do papel das bactérias na microbiota intestinal (SCARSELLA *et al.*, 2020b). O que se sabe é que a microbiota intestinal de cães é complexa, porém ainda se desconhece o que é considerado normal em indivíduos saudáveis e suas variações biológicas (GARCIA-MAZCORRO & MINAMOTO, 2013).

O presente estudo foi realizado em uma área que promove a relação entre humanos, animais domésticos e silvestres em área rural composta principalmente por fazendas de criação de animais, com fragmentos de vegetação nativa. Por conta disso, múltiplos fatores podem ser considerados ao analisar o resultado deste trabalho. Esses fatores devem levar em conta a relação entre a saúde humana, ambiental e animal, conforme preconizado pelo conceito *One world, One Health* (GRUETZMACHER *et al.*, 2021).

Ao nosso conhecimento, este trabalho relata pela primeira vez gêneros bacterianos relacionados a microbiota de *Lycalopex vetulus* e descreve novas associações entre *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* e os diversos gêneros como *Chryseobacterium*, *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Rothia* e *Citrobacter* e os gêneros raramente encontrados em animais silvestres: *Cedecea* e *Wohlfahrtiimonas*,

5.4.1 Saúde humana

A interação diária dos humanos com animais domésticos e de criação pode gerar um alerta quando relatamos o isolamento de bactérias potencialmente patogênicas. Embora o fluxo de transmissão de patógenos ainda seja indeterminado, um caráter zoonótico precisa ser considerado.

Os gêneros bacterianos identificados neste trabalho, como *Acinetobacter*, encontrado em cavidade oral de nove indivíduos das espécies silvestres, *Aeromonas*, detectado em cavidade oral de cão doméstico e cachorro-do-mato, *Pseudomonas,* presente em todos os tipos de amostras de todas as espécies, *Stenotrophomonas*, encontrado em cavidade oral de um cão doméstico, *Brevundimonas* isolado em cavidade oral de um cão doméstico e *Pantoea*, encontrado somente em cachorro-do-mato e raposa-do-campo são considerados patógenos oportunistas em seres humanos (SANZ-GARCIA *et al.*, 2021). Ressalta-se que a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* é considerada um importante patógeno humano, capaz de causar doenças respiratórias, sendo resistente a uma ampla variedade de antibióticos (BROOKE, 2012).

Alguns gêneros bacterianos encontrados em baixa prevalência como, *Cronobacter*, *Pasteurella*, *Myiroides* e *Serratia*, são potenciais patógenos humanos, alguns com capacidade de causar serias infecções, inclusive após a mordedura de animais domésticos (SAPHIR & CARTER, 1976; FERREIRA *et al.*, 2016; BEHARRYSINGH, 2017; PITHADIA *et al.*, 2019; RAZALI *et al.*, 2020; BERTHOLD-PLUTA *et al.*, 2021).

5.4.2 Saúde animal

Dados sobre o potencial de patogenicidade em animais silvestres e cães domésticos limitam se à ocorrência de infecções e presença se sinais clínicos. Entretanto, evidencias apontadas em alguns estudos podem sugerir o papel de determinadas espécies. Por exemplo, o gênero *Neisseria*, encontrado em cavidade oral de todas as espécies, apresentou maior prevalência em cães domésticos e lobos-guará (30% e 27%, respectivamente). Este gênero bacteriano pode promover a formação de placa dentária e já foi descrito em estudo realizado por ELLIOTT *et al.*

(2005) que analisou a microbiota oral cultivável em cães domésticos, apresentando uma prevalência de 10%. Neste mesmo estudo também foram detectados *Streptococcus* e *Filifactor* em saliva. A presença esporádica dos gêneros *Neisseira*, *Pasteurella* e *Bacillus* é relatada, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (SAPHIR & CARTER, 1976). De forma semelhante, o gênero bacteriano *Aerococcus*, encontrado somente em uma amostra de cachorro-do-mato, foi isolado em periodontite em ovinos (BORSANELLI *et al.*, 2021).

Alguns gêneros encontrados em baixa prevalência também são raramente relatados em quadros infecciosos em animais. O gênero *Morganella*, encontrado em baixa prevalência em cachorro-do-mato e raposa-do-campo, é um patógeno oportunista que causa infecções do trato urinário em humanos e cães, encontrado em répteis, golfinhos, havendo um relato de ocorrência em amostra otológica de raposa-de-Darwin (*Lycalopex fulvipes*) no Chile (FERREIRA JUNIOR, 2009; PEREIRA *et al.*, 2016; BRICEÑO, *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2020). Já *Hafnia*, que foi encontrado em cavidade oral e retal no mesmo animal (cahorro-do-mato), foi relatado em um lobo-guará em cativeiro (GILIOLI & SILVA, 2000). Este gênero é amplamente distribuído em diversos ambientes e apesar de ser considerado um patógeno oportunista, sua importância para a medicina veterinária precisa ser mais bem estudada, pois os relatos de infecções em animais são raros (PADILLA *et al.*, 2014). O gênero *Cedecea* foi encontrado na cavidade oral de apenas um animal (cachorro-do-mato) sendo um raro patógeno oportunista, já descrito em trato gastrintestinal de coalas (THOMPSON & SHARKADY, 2020; BOATH *et al.*, 2020). *Rhodococcus*, encontrado somente em amostra retal de um cão doméstico, embora seja raro em animais, pode ser a causa de infecções multissistêmicas (BRYAN *et al.*, 2017).

Outros gêneros bacterianos são raramente relacionados aos cães domésticos e não descritos nas espécies de canídeos silvestres aqui estudadas. Os relatos em cães domésticos não são relacionados com quadros de infecções e podem sugerir uma associação benéfica ou neutra, como exemplo os gêneros *Chryseobacterium*, *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Rothia* e *Citrobacter* que são descritos em cavidade oral, nasal ou retal (SAFIR & CARTER, 1976; BEMIS *et al.*, 2014; ISAIAH *et al.*, 2017; GAMBINO *et al*., 2021 e RAZALI *et al.*, 2020). Já o gênero *Wohlfahrtiimonas*, foi encontrado somente em amostra retal de cão doméstico e de cavidade oral de lobo-guará. A espécie *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*, inicialmente

descrita em larvas de insetos, é um patógeno raro, tendo sido descrito somente treze casos de septicemia, um caso de infecção em casco de vaca, um caso relacionado ao óbito de um golfinho e no Brasil, foi encontrada em frangos obtidos em mercados no estado do Rio de Janeiro (DIAZ-DELGADO *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2016; MATOS *et al.*, 2016 e DOVJAK *et al.*, 2021).

Desta forma relatamos diversas associações de gêneros bacterianos nunca relatados em *Cerdocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex vetulus* e *Canis lupus familiaris*. Destacando que, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo microbiológico com amostras de *Lycalopex vetulus*.

Apesar da avaliação de um potencial compartilhamento da microbiota aeróbia cultivável neste trabalho ser limitada, este estudo tem o papel de servir como base para estudos mais aprofundados. Ao descrever os gêneros bacterianos encontrados em diferentes indivíduos de diferentes espécies que possuem área de vida sobrepostas, é valido sugerir que estudos mais específicos, como de genotipagem das espécies bacterianas encontradas, sejam realizados a partir o material obtido.

5.4.3 Saúde ambiental

Neste estudo foram isolados alguns gêneros com importante papel na saúde ambiental, como por exemplo, *Curtobacterium*, encontrado em cavidade oral de três cães domésticos. Algumas espécies deste gênero são consideradas patógenos de plantas e outras podem atuar na reciclagem de nutrientes em substratos terrestres (CHASE *et al.*, 2016).

Outros gêneros bacterianos são comumente associados à produção animal e são discutidos neste tópico devido à natureza desta atividade, que pode promover uma contaminação ambiental, e à relação ao ambiente em que os animais foram amostrados.

Os gêneros *Bacillus* e *Enterococcus*, que apresentaram alta prevalência nas amostras, *Lactococcus*, encontrado somente em cachorro-do-mato e raposa-do-campo e *Leuconostoc*, isolado somente em amostra retal de um cão doméstico, são considerados microrganismos com propriedades probióticas e muitos são utilizados em formulações comerciais oferecidas aos animais de criação (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Neste sentido, porém abordando um caráter zoonótico, podemos relatar que o gênero *Morganella*, encontrado neste trabalho, é um potencial patógeno humano e

já foi isolado em vacas, trazendo um alerta para a possibilidade de transmissão através do leite (LI *et al.*, 2018). Adicionalmente, gêneros bacterianos encontrados em alta prevalência neste estudo como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e outros raramente isolados como *Brachybacterium*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Paenibacillus*, e *Macrococcus*, foram anteriormente detectados em leite pasteurizado no Brasil, sugerindo a resistência destes microrganismos ao processo (RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2018). Em contraponto, o gênero *Leclercia*, encontrado em amostra retal de um cão doméstico é um raro patógeno de humanos e, em animais, já foi descrito em um quadro de infecção em bovino (CHOUDHARY *et al.*, 2017).

Muitos estudos relacionados com a saúde integrada apontam grande preocupação com a crise da resistência aos antimicrobianos. Nesta perspectiva, sabemos que os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento ou tratamento de infecções em animais de criação em fazendas e quando são eliminados, contaminam os solos e podem alterar a diversidade de microrganismos desse ambiente (JECHALKE *et al.*, 2014). Sendo assim, o Brasil, um grande produtor de animais para consumo, demonstra uma grande vulnerabilidade para a contaminação do solo, principalmente nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato grosso do Sul, Bahia e Goiás (YOPASÁ-ARENAS & FOSTIER, 2018).

No presente estudo, destaca-se que os gêneros *Enterococcus* e *Escherichia* foram isolados em todas as espécies, com prevalência relevante em amostras retais. Ambos os gêneros são resistentes a Tilosina, antibiótico utilizado para tratamento de infecções intestinais em cães e na promoção de crescimento e tratamento de mastite em gado, podendo alterar a microbiota intestinal em cães e permitir o aumento da prevalência destas espécies resistentes em cães (SUCHODOLSKI *et al.*, 2009; MCDOUGALL *et al.*, 2007). Contudo, estudos para avaliação da interferência da contaminação do solo nos animais e humanos ainda são escassos e precisam ser incentivados.

5.5 Estabelecimento da coleção de cultura

O estabelecimento e a manutenção de uma coleção de cultura dos isolados obtidos neste trabalho tem o potencial de permitir o desenvolvimento de estudos mais aprofundados como, por exemplo, através da caracterização de isolados bacterianos pela genotipagem, podendo trazer informações adicionais para a

dinâmica de compartilhamento de patógenos entre os animais. Outra vertente é a utilização dessa colecao de cultura para a seleção de microrganismos com potencial biotecnológico, ou seja, que podem gerar produtos através de processos industriais.

Para ambas as condições, os microrganismos devem ser adequadamente preservados, de forma que suas propriedades originais não se modifiquem e que haja a garantia de manter os microrganismos livres de contaminação e viáveis por longos períodos (DA SILVA & ALTERTHUM, 2020). Assim sendo, o gerenciamento da coleção de culturas na FPZSP visa alcançar o exposto através da manutenção de infraestrutura adequada e equipamentos, monitoramento constante de temperatura dos ultracongeladores, registros para o rastreamento de amostras e verificações periódicas dos isolados.

Além de manter um papel importante na manutenção da saúde humana, animal e ambiental, muitos microrganismos apresentam características que despertam o interesse para aplicação industrial, seja pelo potencial de resolver problemas ambientais ou para desenvolvimento de produtos relacionados à saúde humana e animal.

Este potencial pode ser encontrado em diversos gêneros bacterianos isolados neste trabalho, como por exemplo, *Arthrobacter*, comumente isolado em solo e abrange a espécie *A. humicola* que possui atividade antimicrobiana contra conhecidos patógenos humanos (PRASHANTHI *et al.*, 2021). Os gêneros *Brevibacillus*, *Leclercia* e *Paenibacillus*, são estudados para diferentes aplicações biotecnológicas, como na formulação de promotores de crescimento e controle biológico para a agricultura (GRADY *et al*., 2016; PEREIRA *et al.*, 2018; OREM *et al.*, 2019 e SNAK *et al.*, 2020). Outros gêneros como *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Solibacillus* produzem substâncias de interesse biotecnológico e podem atuar em processos de biorremediação e biodegradação (ARENSKÖTTER *et al.*, 2004; LU, *et al.*, 2009 e PASCON *et al.*, 2011).

5.6 Análises moleculares

Após a identificação através de MALDI-TOF e com base na revisão da literatura para o Capítulo II, foi possível identificar os gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas* que são potenciais produtores de PHAs. Diante desta informação, isolados pertencentes a ambos os gêneros selecionados para os testes de produção

de PHA, e o isolado MA09B identificado como *P*. *monteilii*, (espécie provável) através da técnica de MALDI-TOF, apresentou o resultado mais promissor e foi selecionado para um estudo filogenético. Devido à falta de estudos relacionados ao potencial de produção de PHA desta espécie e a sua baixa ocorrência neste estudo, o isolado 416O, também identificado como *P*. *monteilii*, foi analisado juntamente ao isolado MA09B. Os detalhes das análises referentes à produção de PHA são abordados no Capítulo II deste trabalho.

5.6.1 Análise de 16S rRNA

Através do sequenciamento gênico de 16S rRNA e montagem das sequências consenso foi possível obter fragmentos de 1301 pb e 1279 pb para os isolados MA09B e 416O, respectivamente. Essas sequências foram inicialmente analisadas através do BLAST® para direcionamento do gênero a ser trabalhado. O resultado indicou diversas espécies do gênero *Pseudomonas* para ambos os isolados, sendo que as cinco espécies que apresentaram o maior percentual de identidade foram: *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. taiwanensis*, *P. entomophila* e *P. mosselii*.

Diante do resultado da análise do BLAST®, que indicou uma alta probabilidade dos isolados pertencerem ao gênero *Pseudomonas*, foi realizado um levantamento de todas as espécies validadas deste gênero e obtenção das sequências para prosseguir com as analises filogenéticas.

Foi verificado que nos dois últimos anos, muitas espécies deste gênero foram descritas formalmente. Diante disso, além das espécies validadas pela LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature), consideramos espécies recentemente descritas e devidamente publicadas como uma forma de englobar as espécies que ainda não foram validadas devido ao tempo de publicação. Da mesma forma, foram excluídas das análises as espécies com sequências inferiores a 1000 pb, com a finalidade de não comprometer a qualidade das análises.

A análise inicial, realizada com as sequências dos dois isolados, junto com 283 sequências de espécies do gênero *Pseudomonas* e a sequência de *Staphylococcus aureus* como *outgroup*, permitiu estabelecer um valor máximo de distância filogenética de 0,01 para seleção de espécies para as próximas análises. Desta forma, 18 espécies com valores iguais ou inferiores ao valor estabelecido foram selecionadas para prosseguir com as análises do isolado MA09B e 13

espécies para o isolado 416O. Nesta etapa, após a construção da matriz de distância (APÊNDICE D e E), e análise dos 03 métodos para a inferência filogenética, verificou-se que os métodos Máxima Verossimilhança e *Neighbour-joining* apresentaram topologia de árvores semelhantes e os dados corroboram com a matriz de distância, enquanto o método de Máxima Parcimônia posicionou ambos os isolados como um grupo externo, não representando os resultados da matriz de distância e por isso não foi considerado nesta análise. (Figuras 9-12).

Figura 9 - Topologia de árvore filogenética para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de MA09B, construída através do método Máxima Verossimilhança, utilizando Kimura-2-parâmetros. Valores de bootstrap acima de 60% são apresentados.

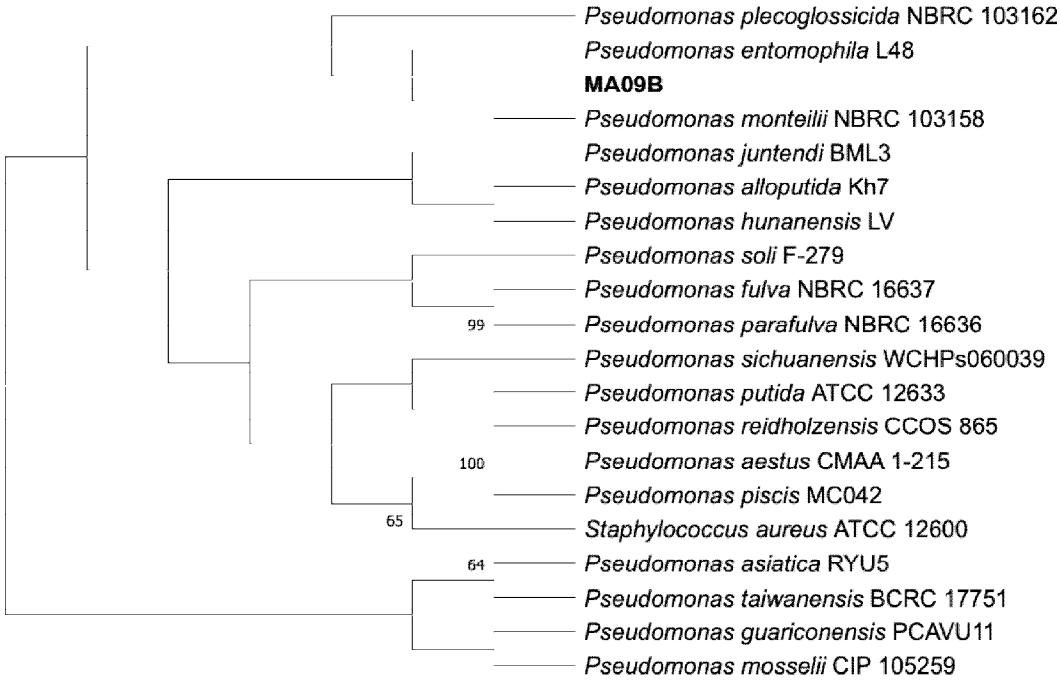


Figura 10 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de MA09B, construída através do método *Neighbour-joining*, utilizando distância p. Valores de *bootstrap* acima de 60% são apresentados.

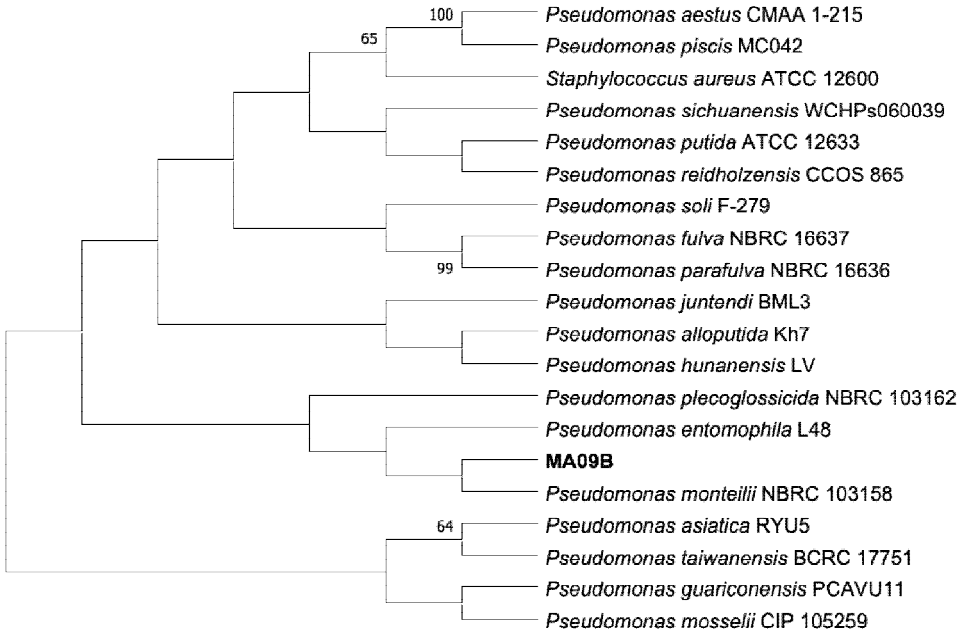


Figura 11 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de 416O, construída através do método Máxima Verossimilhança, utilizando Kimura-2-parâmetros. Valores de *bootstrap* acima de 60% são apresentados.

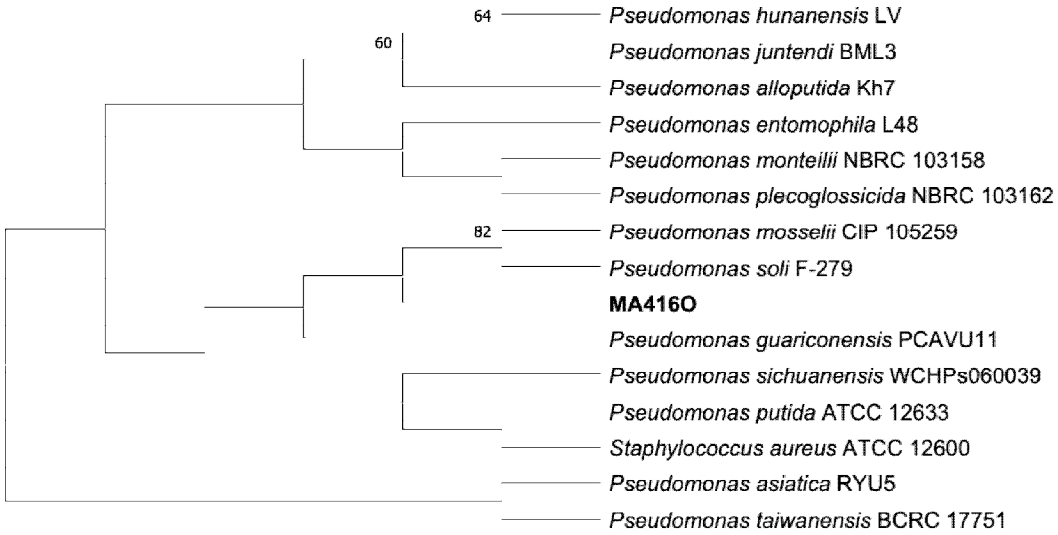
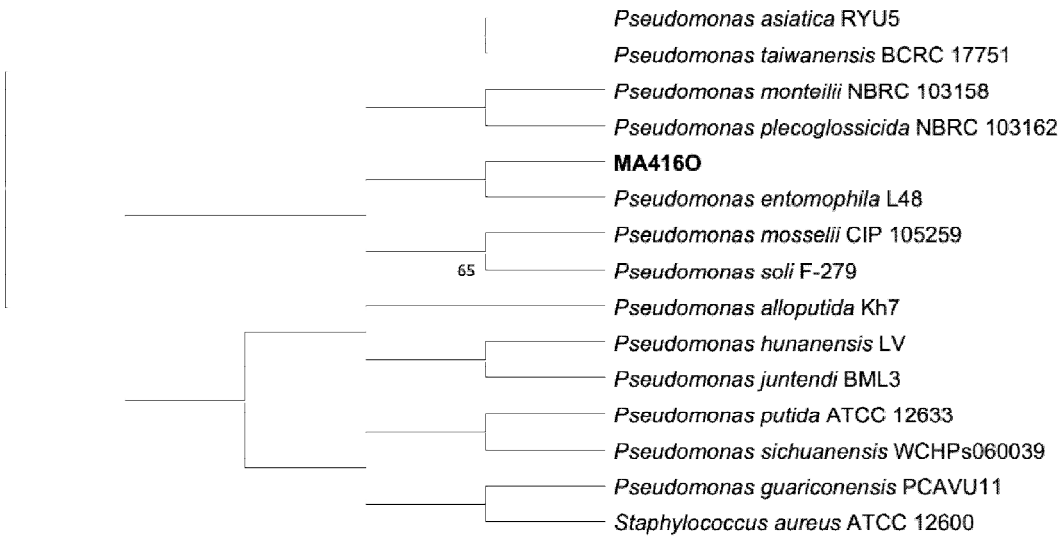


Figura 12 - Topologia de árvore para sequências de 16S rRNA, para inferência filogenética de 416O, construída através do método *Neighbour-joining*, utilizando distância p. Valores de *bootstrap* acima de 60% são apresentados.



Por meio da análise da matriz de distância de 16S rRNA do isolado MA09B, podemos verificar que 05 espécies apresentam 99,9% de identidade com o isolado analisado, não sendo possível inferir a qual espécie este isolado provavelmente pertence. De forma semelhante, o isolado 416O, apresenta entre 99,7% e 99,8% de identidade com as mesmas espécies de MA09B, além de *P. mosselii*.

Isso acontece, pois, a região 16S rRNA para o gênero *Pseudomonas* permite diferenciá-lo de outros gêneros da família Pseudomonadaceae, mas não é possível distinguir as espécies do gênero (GIRARD *et al.*, 2020). Portanto, através dessa análise do gene 16S rRNA, podemos afirmar que os isolados estudados pertencem ao gênero *Pseudomonas*, corroborando com os resultados de MALDI-TOF e BLAST®, mas não há possibilidade de inferir a espécie.

5.6.2 Análise dos genes housekeeping

Diante disso, para prosseguir com caracterização molecular dos isolados, foi incluída a análise com genes *housekeeping* e *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA),

com o intuito de chegar o mais perto possível da provável espécie, os genes selecionados foram *rpo*B, *rpo*D, *gyr*B, além do 16S rRNA, que são amplamente utilizados para as análises filogenéticas do gênero *Pseudomonas*. As análises filogenéticas foram realizadas com todos os genes separadamente para cada isolado e com os genes concatenados. Para todas as análises, utilizou-se a distância *p* como parâmetro para a construção da matriz de distância e o método *Neighbour-joining*, a distância *p* como modelo de substituição e *bootstrap* com 1000 réplicas como teste de confiança, para a obtenção das árvores filogenéticas.

As espécies do gênero *Pseudomonas* escolhidas para estas análises foram as que demonstraram menor distância com os isolados MA09B e 416O na análise do gene 16S rRNA, conforme descrito no subitem 4.4.1. Os valores de distância estipulados para a seleção das espécies foi 0,0008 e 0,0031 para MA09B e 416O, respectivamente. Desta forma, após a seleção das espécies, as sequências nucleotídicas das linhagens tipo para cada gene foi obtida no GenBank® (Tabela 3). Nestas análises, a espécie *Morganella morganii*, bacilo Gram negativo, foi escolhido como *outgroup*, pois foi possível obter sequências da linhagem tipo para todos os genes estudados e as sequências obtidas possuíam tamanhos similares aos analisados, não comprometendo a qualidade das análises.

Tabela 3 - Sequências utilizadas para MLSA

Espécie	**Linhagem tipo**	**16SrRNA***	***rpoB****	***rpoD****	***gyrB****
P. asiatica	RYU5^T	MH517510	NZ_BLJF01000002.1	LC435053	NZ_BLJF01000003.1
P. entomophila	L48^T	AY907566	CT573326.1: 502974-507047	AY907568.1	AY907567.1
P. monteilii	NBRC 103158^T CIP 104883^T DSM 14164^T	AB681966	AJ717455	FN554488.1	FN554205
P. mosselii	CIP 105259^T ATCC BAA-99^T	AF072688	FN554744	FN554491.1	FN554207
P. plecoglossicida	NBRC 103162^T CIP 106493^T	AB681970	AJ717456.1	FN554503.1	FN554218
P. taiwanensis	BCRC 17751^T DSM 21245^T	EU103629	HE577797.1	HE577796.1	HE800487.1
Morganella morganii	ATCC 25830^T	NR_117793	DQ836276.1	HM122067.1	HM122057.1

* Número de acesso no GenBank

Análises envolvendo o gene *rpo*B, que codifica a subunidade beta da enzima RNA polimerase, tem sido amplamente executada para estudos filogenéticos do gênero *Pseudomonas* (TAYEB *et al.*, 2005; MULET *et al.*, 2010). Esta subunidade da RNA polimerase é responsável pela maioria das reações catalíticas e sua aplicação nos estudos filogenéticos tem permitido esclarecer as relações entre as espécies bacterianas, enquanto o gene 16S rRNA se mantém aplicável para estudos em nível de gênero (ADÉKAMBI *et al.*, 2009).

As análises filogenéticas do gene *rpo*B para o isolado MA09B demonstraram um agrupamento com a espécie *P. asiatica* na topologia de árvore apresentando um valor de *bootstrap* de 98% (FIGURA 13). Este dado corrobora com o resultado da matriz de distância (APÊNDICE F), que apresentou 99% de identidade com a mesma espécie. Porém, a análise do mesmo gene para o isolado 416O, demonstrou pouca diferença na distância entre as espécies analisadas (APÊNDICE G). O percentual de identidade variou entre 93% e 95% e a topologia da árvore filogenética apresentou o isolado como um grupo externo de quatro outras espécies (FIGURA 14).

Figura 13 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*B para o isolado MA09B, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

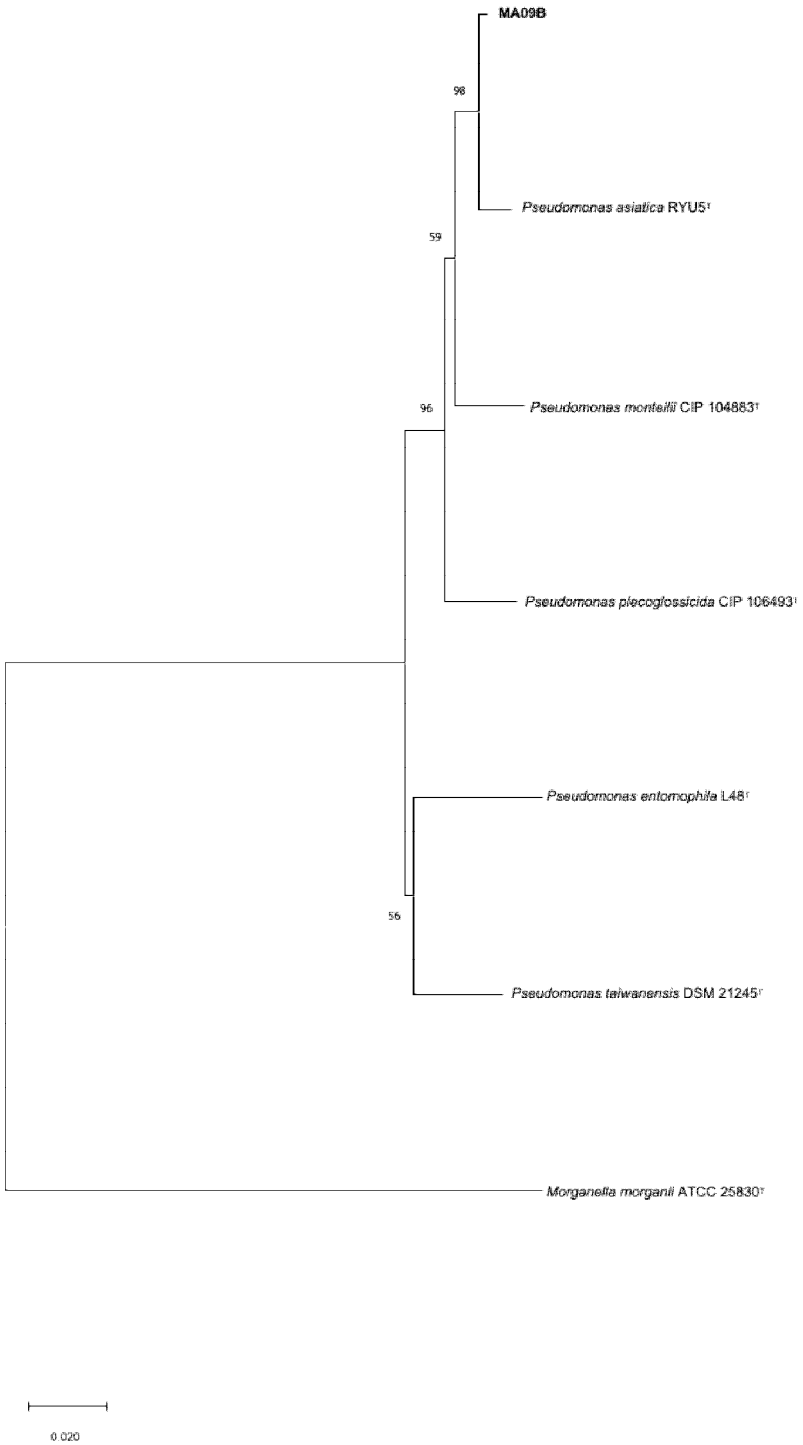
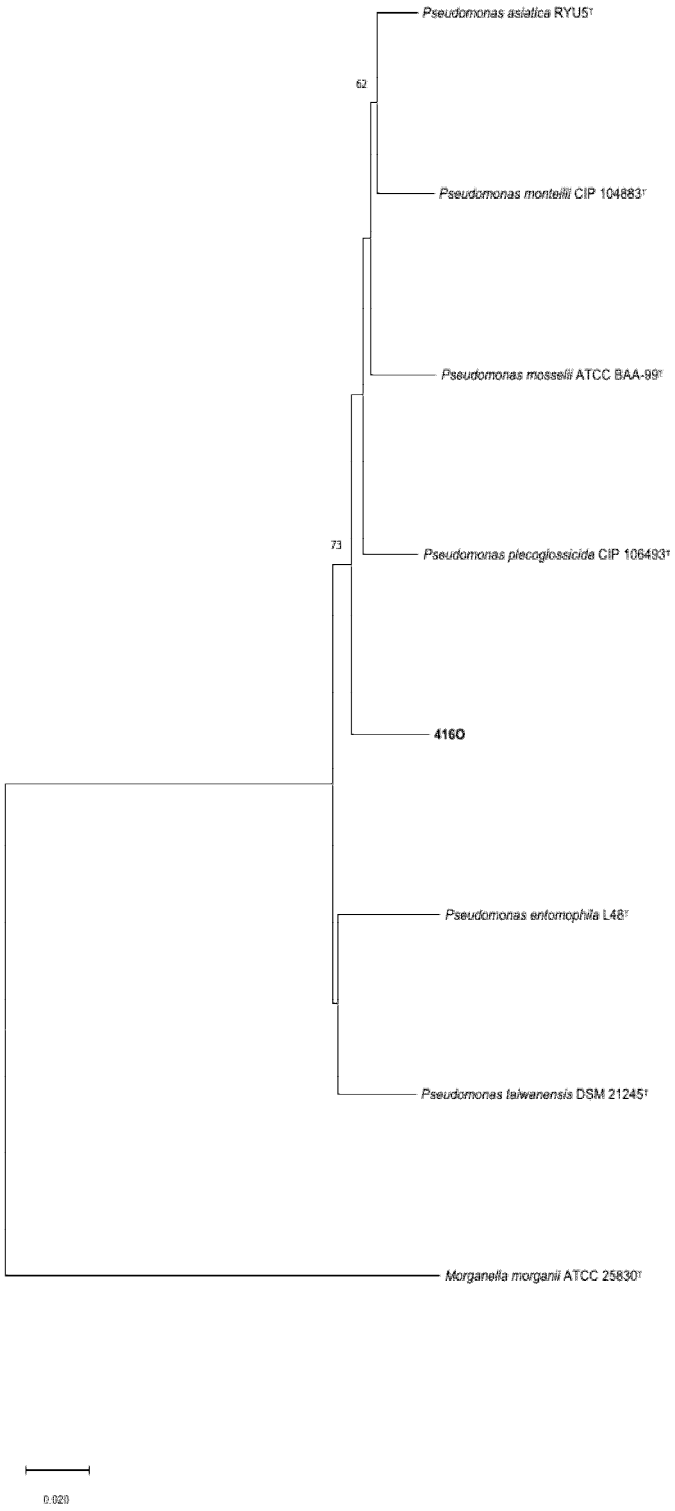


Figura 14 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*B para o isolado 416O, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.



O gene *rpo*D codifica o fator sigma da RNA polimerase, sendo o principal responsável pela transcrição de genes *housekeepings* (YAMAMOTO *et al.*, 2000). Sua aplicação em estudos de filogenia bacteriana demonstra resultados satisfatórios para a identificação de espécies do gênero *Pseudomonas*, porém os dados disponíveis para este gene ainda são limitados, dificultando seu uso em alguns casos (MULET *et al.*, 2009).

A análise deste gene neste estudo demonstrou que o isolado MA09B apresenta a menor distância filogenética com a espécie *P. asiatica* (APÊNDICE F), apresentando 96,5% de identidade e a agrupamento na topologia da árvore filogenética com valor de *bootstrap* de 98% (FIGURA 15). O mesmo não aconteceu com o isolado 416O, que apresentou valores de distância maiores (APÊNDICE G), e o maior percentual apresentado foi de 92,3% com a espécie *P. mosselii* (FIGURA 16).

O gene *gyr*B codifica a subunidade beta da enzima girase, responsável por desemaranhar o DNA durante a replicação e vem sendo utilizado em estudos filogenéticos do gênero *Pseudomonas* (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 2000; MULET *et al.*, 2010). A análise deste gene para o isolado MA09B corroborou com os dados das análises dos genes anteriores, apresentando a menor distância filogenética com a espécie *P. asiatica* (APÊNDICE F), com 95,4% de identidade que foi demonstrado na árvore filogenética, onde estas espécies foram agrupadas no mesmo ramo com valore de *bootstrap* de 82% (FIGURA 17). Como na análise do gene anterior, o isolado 416O apresentou maiores distâncias com as outras espécies analisadas (APÊNDICE G). O maior percentual de identidade foi 92,1% com a espécie *P. plecoglossicida* e a topologia da árvore filogenética demonstrou um agrupamento com as espécies *P. entomophila* e *P. monteilli* com valor de *bootstrap* de 94% (FIGURA 18).

Figura 15 - Topologia de árvore filogenética do gene *rpo*D para o isolado MA09B, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

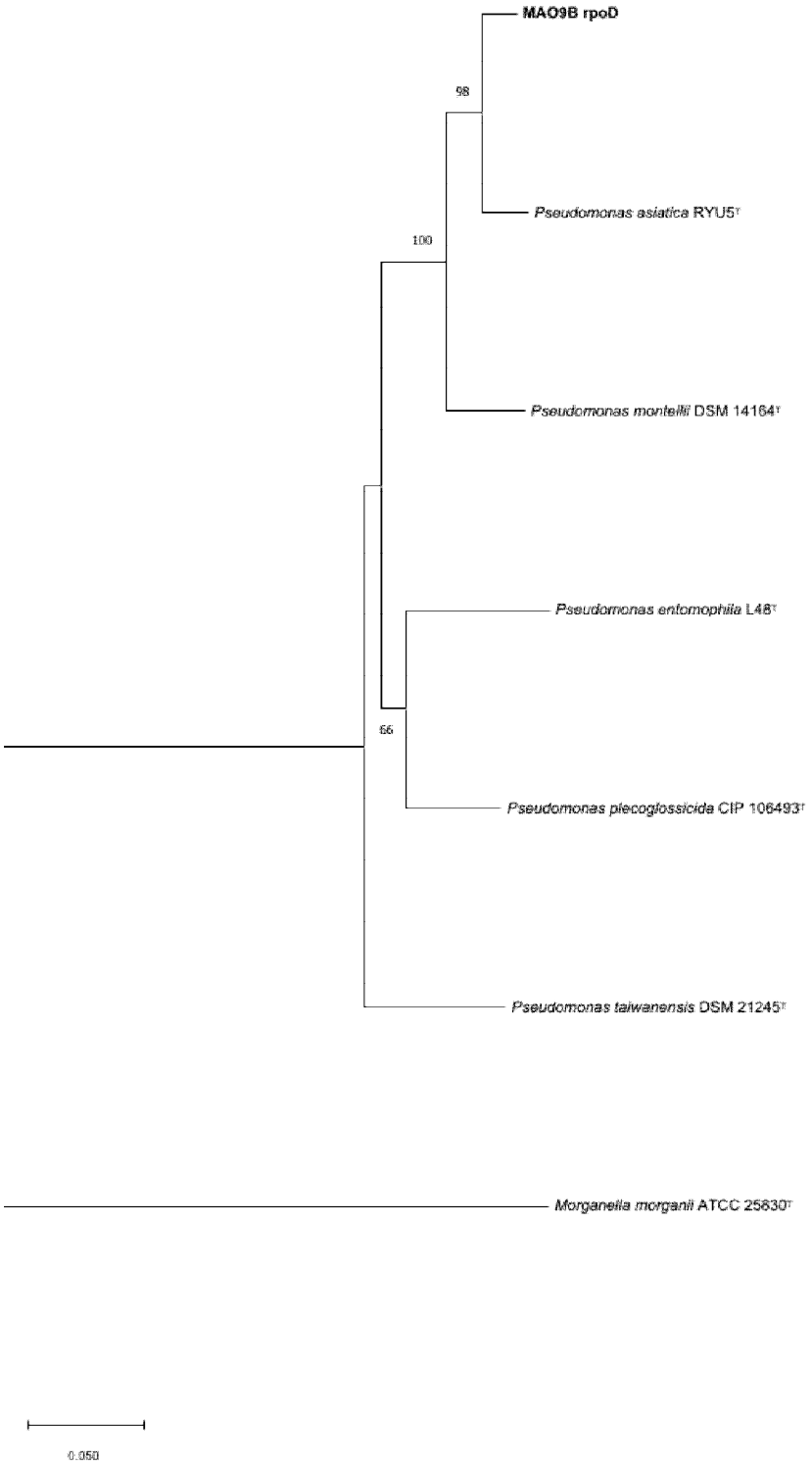


Figura 16 - Topologia de Árvore filogenética do gene *rpo*D para o isolado 416O, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

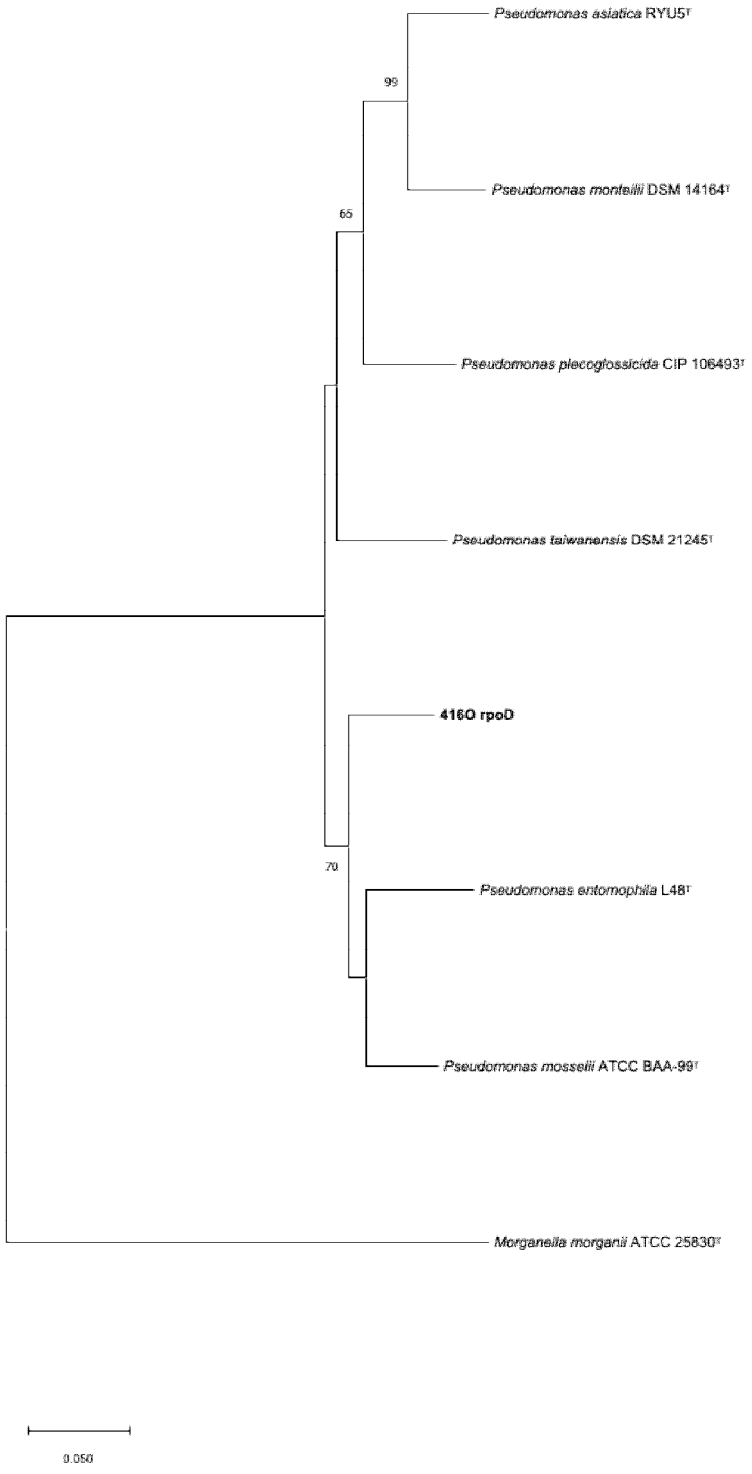


Figura 17 - Topologia de árvore filogenética do gene *gyr*B para o isolado MA09B, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

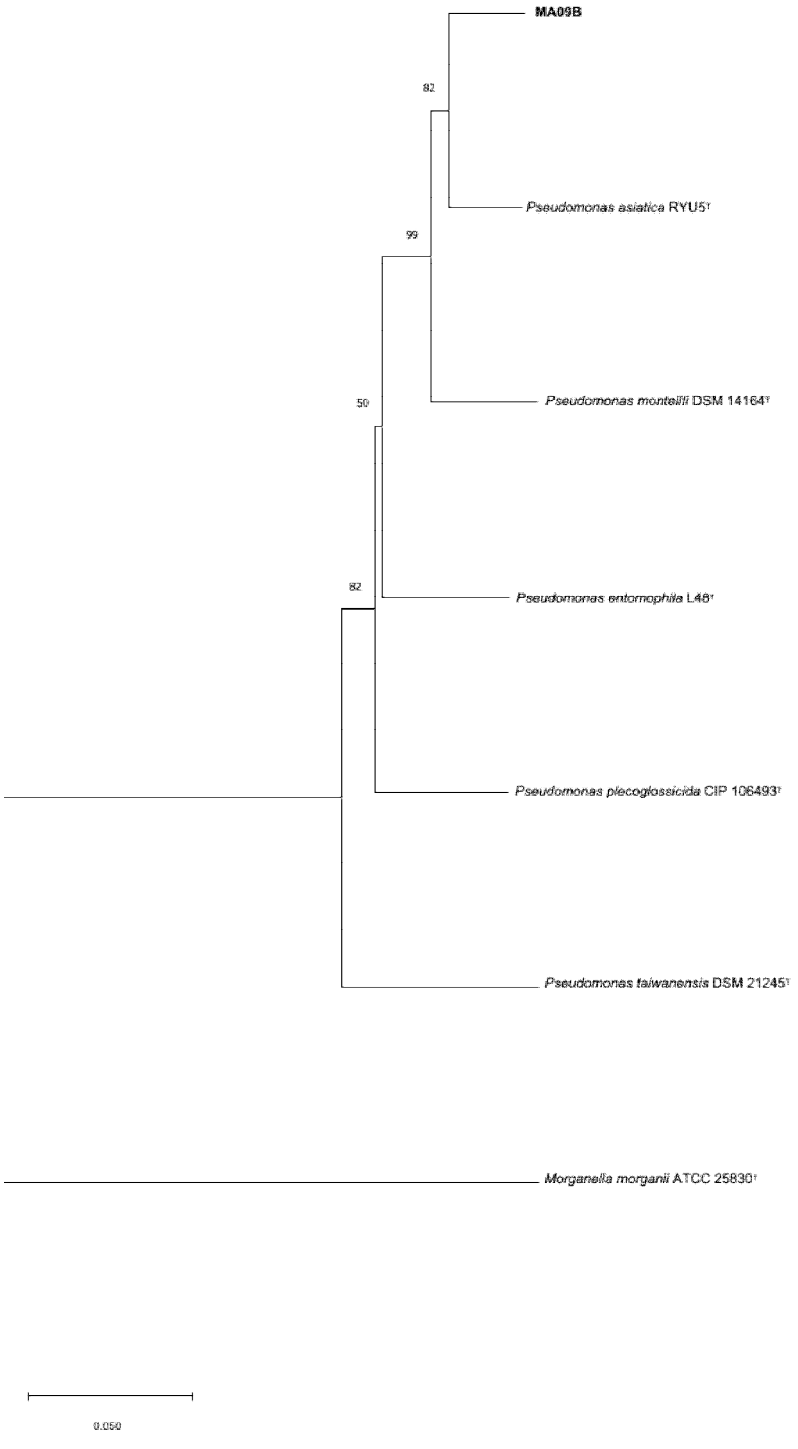
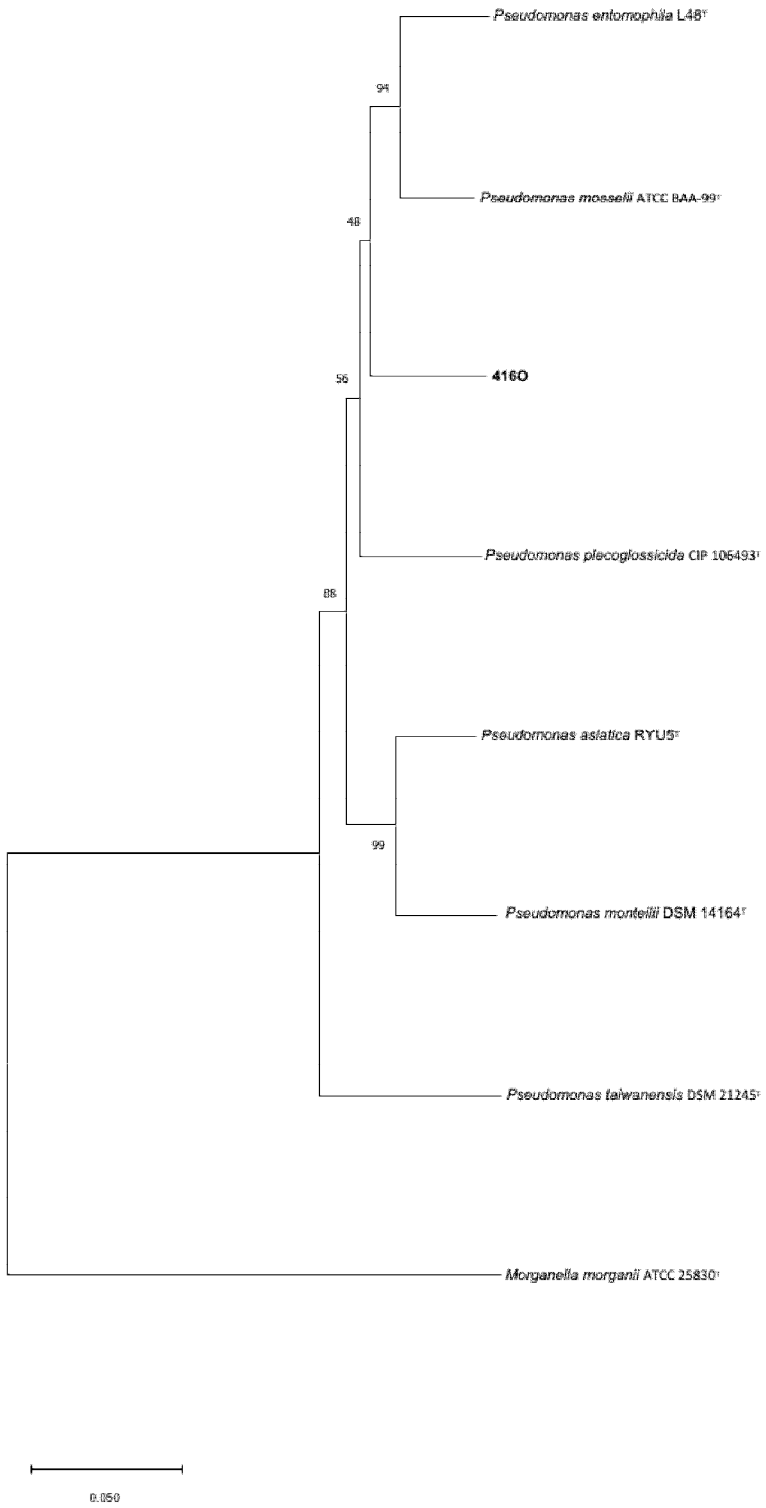


Figura 18 - Topologia de árvore filogenética do gene *gyr*B para o isolado 416O, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.



5.6.3 Análise MLSA

Após a análise individual dos genes *housekeeping*, os mesmos foram concatenados, adicionando-se as sequências do gene 16S rRNA para a análise MLSA. As sequências concatenadas possuem 3655 pb e 3653 pb para os isolados MA09B e 416O, respectivamente.

A análise de MLSA para o isolado MA09B corroborou as análises anteriores com os genes *housekeeping*, demonstrando que a espécie *P*. *asiatica* apresenta a menor distância filogenética (APÊNDICE F) e percentual de identidade de 98,1%, que pode ser demonstrado na topologia da árvore filogenética com *boostrap* de 100% (FIGURA 19).

No entanto, para o isolado 416O, esta análise foi menos representativa. A matriz de distância demonstrou baixa diferença entre os valores das espécies analisadas (APÊNDICE G), resultando em um percentual de identidade entre 94% e 95,7%. Este dado também é evidenciado pela topologia da árvore filogenética, onde o tamanho dos ramos dos agrupamentos é bastante similar entre as espécies (FIGURA 20).

A análise de MLSA a partir da concatenação dos quatro genes aqui estudados (16S rRNA, *rpo*B, *rpo*D e *gyr*B) demonstrou ser satisfatória para a identificação de espécies do gênero *Pseudomonas* (MULET *et al.*, 2012a. GOMILA *et al.*, 2015; PEIX *et al.*, 2018), sendo que as sequências de MLSA da mesma espécie apresentam identidade igual ou superior a 97% (MULET *et al.*, 2010 e MULET *et al.*, 2012b). Analisando as matrizes de distância calculadas neste estudo foi possível validar essa informação, pois as sequências das diferentes espécies estudadas apresentaram identidade inferior a 97%.

Desta forma, a análise de MLSA do isolado MA09B demonstra alta probabilidade do isolado pertencer à espécie *P*. *asiatica*, com 98,1% de identidade, sendo que o percentual de identidade com as outras espécies avaliadas ficaram abaixo de 97%, porém é importante ressaltar que o percentual de identidade com a espécie *P*. *monteilii*, embora não tenha atingido o valor de corte estipulado, apresentou valor muito próximo a ele (96,9%).

Figura 19 - Topologia de árvore filogenética de MLSA para o isolado MA09B, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

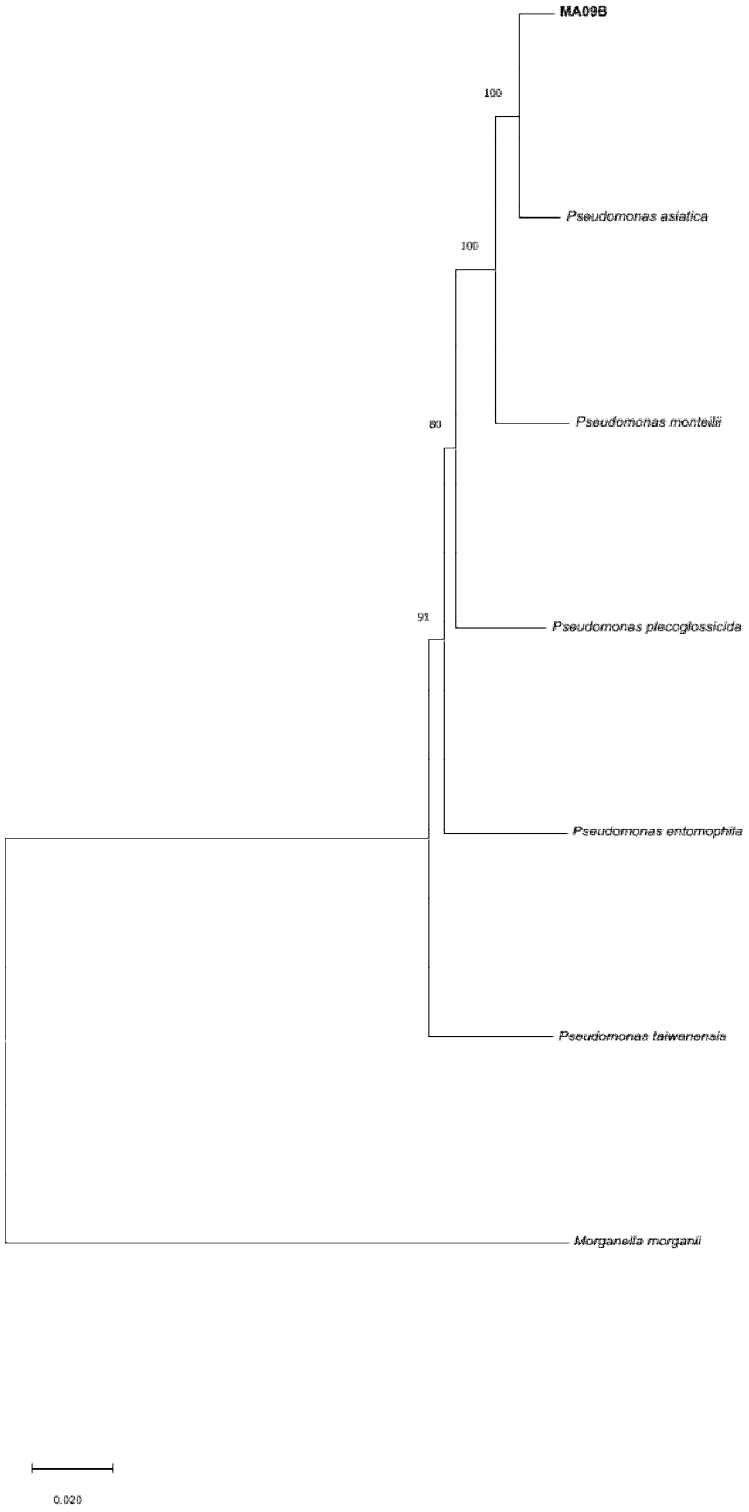
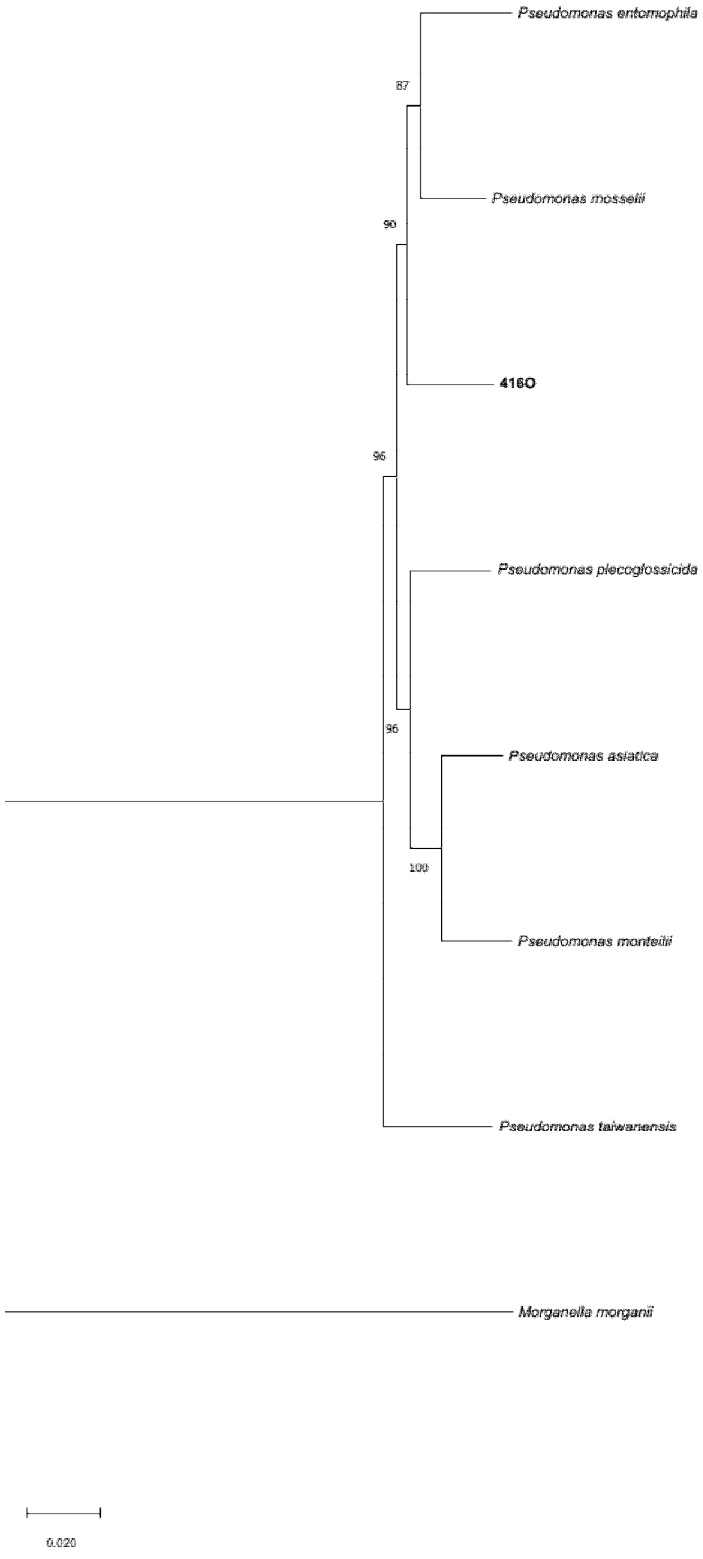


Figura 20 - Topologia de árvore filogenética de MLSA para o isolado 416O, construída através do método *Neighbour-joining* e distância p. Valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.



Por outro lado, o isolado 416O não apresentou percentual de identidade acima de 97% com nenhuma das espécies analisadas, sendo o valor mais alto encontrado com a espécie *P. mosselii* (95,7%).

Os isolados MA09B e 416O, obtidos em amostras de cavidade oral de cachorro-do-mato e raposa-do-campo, respectivamente, foram analisados separadamente através de MLSA, para avaliar a possibilidade dos isolados MA09B e 416O pertencerem à mesma espécie. Entretanto, a comparação das sequências nucleotídicas dos genes concatenados entre ambas as espécies resultou em 94,5% de identidade.

Diante desses resultados, diferentes tipos de análises são necessárias para avaliar se os isolados tratam-se de espécies ainda não descritas e embora o estudo filogenético não seja o cerne deste trabalho, foram realizados testes fenotípicos com o intuito de obter maiores informações acerca destes isolados.

Todas as sequências gênicas obtidas nesse estudo foram depositadas no Genbank (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de acesso das sequências depositadas no GenBank

Isolado	16S rRNA	*rpo*B	*rpo*D	*gyr*B
MA09B	MZ948934	MZ995191	MZ995193	MZ995195
416O	MZ948933	MZ995192	MZ995194	MZ995196

5.7 Testes fenotípicos

Diante dos resultados obtidos para os isolados analisados, os testes fenotípicos foram realizados e a cepa *P. aeruginosa* NEWP0053 (Newprov) foi utilizada como controle.

O resultado do teste em API20NE para a cepa controle apresentou 99,9% de possibilidade para *P. aeruginosa*, validando o teste realizado. Os isolados MA416O e MA09B apresentaram resultado da possibilidade de identificação como *P. fluorescens* (65% e 92,8%, respectivamente).

É importante ressaltar que até o momento das análises, o banco de dados do fabricante não era provido de informações para as espécies analisadas por MLSA. Desta forma, não seria possível retornar resultados mais precisos.

Analisando os resultados dos testes fenotípicos quando comparados aos

dados já publicados referentes às linhagens tipo das espécies estudadas em MLSA é possível observar que o isolado MA09B possui cinco características divergentes de *P*. *asiatica* RYU5 (redução de nitrato, produção de indol e assimilações de de N-acetil-glicosamina, maltose e ácido adípico) (Tabela 5).

Embora o isolado 416O não tenha apresentado um percentual de identidade acima de 97% na análise de MLSA, ao realizar a comparação dos testes fenotípicos entre as espécies, apresenta sete resultados divergentes de *P*. *mosselii*, espécie que apresentou o maior percentual de identidade. Por outro lado, apenas 03 resultados foram divergentes da *P*. *plecoglossicida*, espécie com o segundo maior percentual de identidade.

Comparando os resultados fenotípicos de MA09B e 416O entre si, podemos observar cinco resultados divergentes.

Ambos os isolados submetidos às análises filogenéticas neste estudo foram identificados como *P*. *monteilli* através da técnica de MALDI-TOF, que é uma técnica robusta e rápida para identificação de microrganismos, podendo chegar a 98,2% de espécies identificadas corretamente (CHEN *et al.*, 2021). Entretanto, um importante fator limitante desta técnica é a necessidade constante de atualização da base de dados, devido à alta taxa de descrição e reclassificação de espécies bacterianas. O banco de dados para o gênero *Pseudomonas* é constituído por somente 20 espécies, categorizadas em: *P*. *aeruginosa*, grupo de *P*. *fluorescens*, *P*. *oryzihabitans*, grupo de *P*. *putida* e grupo de *P*. *stutzeri*, demonstrando assim, baixa representatividade do gênero, que possui atualmente 265 espécies descritas.

Diante das análises de 16S rRNA e MLSA associados ao perfil fenotípico, podemos sugerir que os resultados apontam a probabilidade de que os isolados MA09B e 416O não pertençam a mesma espécie e que tratam de espécies ainda não descritas na literatura. Todavia, são necessários novos testes, não previstos neste estudo para a confirmação desta afirmação, e em caso afirmativo, outros testes preconizados para descrição de espécies bacterianas devem ser realizados.

Tabela 5 - Resultados de testes fenotípicos em API20NE

Teste	09B	416O	RYU5	CFML 90-83	CFML 90-60	FPC 951	CMS	L48
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento 42°C	-	-	-	-	-	-	+	+
API20NE								
Redução de nitrato	+	+	-	-	-	+	-	-
Produção de indol	-	-	+	-	-	-	-	-
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolase	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	+[a]	+	-	-	-
Hidrolise da esculina	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise da gelatina	-	+	-	-	-	-	-	+
β-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação:								
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	-	+	-	+	-
Manose	+	+	+	+	-	-	-	+
Manitol	-	-	-	+	-	-	-	+
N-acetil-glicosamina	+	-	-	+	-	-	-	+
Maltose	+	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato de potássio	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido caprílico	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido adípico	-	-	+	+	-	-	-	-
Ácido málico	+	+	+	+	-	+	+	+
Citrato trissódico	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido fenilacético	+	-	+	+	+	+	+	+
Citocromo oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+

Resultados dos testes referentes às linhagens tipos, obtidos nos respectivos artigos de descrição de espécie. RYU5 - *P. asiatica* (TOHYA *et al*., 2019), CFML 90-83 - *P. mosseli*i (DABBOUSSI, *et al*., 2002), CFML 90-60 - *P. monteilii* (Elomari *et al*., 1997), FPC 951 - *P. plecoglossicida* (NISHIMORI *et al*., 2000), CMS - *P. taiwanensis* (WANG *et al*., 2010) e L48 - *P. entomophila* (MULET *et al*., 2012b). a *P. mosselii:* resultado obtido em (MULET *et al*., 2012b).

6 CONCLUSÃO

Os gêneros bacterianos isolados através de técnicas dependentes de cultivo em amostras de cavidade oral e retal de canídeos silvestres e cães domésticos são descritos neste trabalho. Embora não seja possível estabelecer uma relação direta entre os animais através dos microrganismos isolados, foi possível perceber uma semelhança no perfil de prevalência bacteriana entre raposa-do-campo e cachorro-do-mato. Portanto, concluímos que partir destes dados, muitas perguntas podem ser formuladas e novos estudos propostos para a melhor compreensão da relação entre os microrganismos e hospedeiro devem ser encorajados.

Potenciais patógenos foram aqui descritos, bem como novas associações entre microrganismo e hospedeiros, demonstrando que a diversidade de microrganismos em animais silvestres ainda é pouco explorada. Para isso, técnicas que envolvem o uso de marcadores moleculares podem ser úteis para estabelecer uma relação dos microrganismos isolados entre os animais estudados.

Foi apontada uma possível interferência na microbiota dos animais silvestres devido à ação antrópica, que deve ser investigada, pois o uso indiscriminado de antibióticos é uma preocupação mundial e contribuir com dados que possam embasar a regulamentação do seu uso através de políticas públicas são essenciais.

A abordagem utilizada para a obtenção dos microrganismos permitiu o estabelecimento de uma coleção que conta com 1535 isolados bacterianos. Esta característica confere uma vantagem aos métodos independentes de cultivo, já que é possível reativar os isolados para testes fenotípicos, por exemplo, que são obrigatórios para a descrição de espécies novas.

MALDI-TOF demonstra ser uma técnica muito útil para a identificação de gêneros bacterianos, principalmente quando se tem uma grande quantidade de isolados a serem identificados. Entretanto, para determinados grupos, como o gênero *Pseudomonas*, as espécies podem ser identificadas erroneamente, devido à limitação do banco de dados. Trabalhos que desenvolvam métodos para a expansão das espécies constituintes desses bancos de dados devem ser encorajados.

Através do uso de técnicas moleculares para a identificação bacteriana foi possível observar que o isolado MA09B apesar de apresentar um percentual de identidade alto com a espécie *P. asiatica* possui testes fenotípicos discrepantes e o isolado 416O apresentou um percentual de identidade baixo com as espécies

estudadas e ambos os isolados possuem divergências moleculares e fenotípicas entre eles. Esses resultados podem indicar possível identificação de duas novas espécies e precisam ser investigadas.

O material obtido neste trabalho apresenta um grande valor científico, destacando uma diversidade bacteriana pouco explorada e que pode ser acessada para novas pesquisas e diferentes abordagens, com potencial de obter maiores informações acerca da relação entre os animais, o homem e meio ambiente, e encontro de espécies bacterianas ainda não descritas.

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DE POTENCIAL DE BACTÉRIAS OBTIDAS DE CANÍDEOS SILVESTRE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1950, o plástico derivado do petróleo vem sendo amplamente utilizado no mundo todo e, somente em 2018, 359 milhões de toneladas de plástico foram produzidos mundialmente (PLASTICSEUROPE, 2019). O plástico é um polímero sintético, barato e devido as suas propriedades físicas, é altamente versátil (BOEY *et al*., 2021). No entanto, por se tratar de um produto que não é naturalmente degradável, o seu descarte inadequado no ambiente gerou uma preocupação mundial, ameaçando a saúde humana, animal e ambiental (SHEN *et al*., 2020). Estima-se que pelo menos 8 milhões de toneladas de plásticos sejam responsáveis pela contaminação dos oceanos por ano, causando um grande impacto à fauna marinha (IUCN, 2018).

Para minimizar este impacto, alternativas ao uso do plástico sintético têm sido exaustivamente buscadas e o desenvolvimento de plásticos biodegradáveis tem sido explorado. Os plásticos biodegradáveis podem ser produzidos a partir de polímeros naturais como celulose, amido ou ser produzido por microrganismos (LEE, 1996; MUHAMMADI *et al*., 2015; SHEN *et al*., 2020; SARATALE *et al*., 2021). Entre os biopolímeros, produzidos por diferentes tipos de bactérias estão os polihidroxialcanoatos (PHA). Entretanto, os custos para a produção de PHAs em escala industrial dependem de uma série de fatores como o custo do substrato utilizado como fonte de carbono, a capacidade de acúmulo de PHA pelo microrganismo e o processo de extração do polímero (FAVARO *et al*., 2019).

Portanto, para viabilizar a produção de PHAs em escala industrial busca-se o uso de uma fonte de carbono de baixo custo que pode ser alcançada através do uso de resíduos industriais (SARATALE *et al*., 2021). Outras estratégias envolvem a busca de novas linhagens de microrganismos capazes de realizar uma boa conversão destas fontes de carbono de baixo custo em PHA ou o melhoramento genético de microrganismos para aumentar a eficácia da produção de PHA (FAVARO *et al*., 2019).

Além da produção de PHA, muitas bactérias são capazes de produzir outras

substâncias com aplicabilidade biotecnológica, como por exemplo os ramnolipídeos, podendo até mesmo ser produzidos concomitantemente à produção de PHA (HORI *et al*., 2002). Os ramnolipídeos são potenciais agentes biossurfactantes, possuindo uma variedade de aplicações como descontaminação de áreas onde houve derramamento de óleo, remoção de metais tóxicos do solo, apresentando uma alternativa ecológica aos surfactantes químicos (HORI *et al*., 2002).

Nesta perspectiva, novas fontes de microrganismos podem ser exploradas para o encontro de novas linhagens de microrganismos. Considerando que este estudo promoveu o estabelecimento de uma coleção de bactérias isoladas em canídeos silvestres em vida livre, conforme descrito no Capítulo I, optou-se por avaliar o potencial de isolados bacterianos desta coleção para aplicação biotecnológica, através de testes para a produção de PHAs e ramnolipídeos. Com base na revisão da literatura, relacionando espécies produtoras em potencial e as espécies encontradas neste trabalho, buscamos avaliar se esta fonte, nunca acessada para essa finalidade anteriormente, pode abrigar microrganismos capazes de viabilizar a produção de biopolímeros e biossurfactantes em larga escala.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

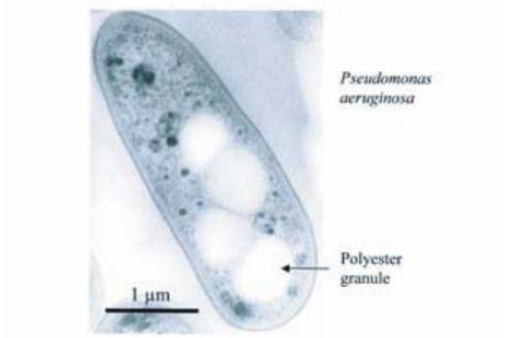
2.1 Polihidroxialcanoatos

PHAs são poliésteres sintetizados por diversas espécies de bactérias, sendo armazenados no interior da célula na forma de grânulos e utilizados como reserva de carbono e energia (ANDERSON & DAWES, 1990). Cada célula pode acomodar cerca de 6 a 8 grânulos de PHA (Figura 21) e os grânulos, que possuem características amorfas, são envoltos por uma membrana fosfolipídica (REHM, 2003).

O PHA é produzido quando há a limitação de nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, como nitrogênio, fosforo, enxofre ou magnésio e oferta em excesso de fonte de carbono, entretanto, determinadas espécies de bactérias, acumulam este polímero durante a fase de crescimento (LEE, 1996).

Cerca de 150 monômeros diferentes são reconhecidos atualmente como constituintes de PHA e o tamanho do monômero interfere diretamente nas propriedades físico-químicas dos PHAs. Os polímeros compostos por monômeros contendo de 3 a 5 átomos de carbono são chamados de PHAscl (*short chain lenght*) e apresentam uma estrutura altamente cristalina e rígida, enquanto os polímeros que contêm monômeros com 6 a 14 átomos de carbono são conhecidos como PHAmcl (*medium chain lenght*) e são menos cristalinos e mais maleáveis (STEINBÜCHEL *et al*., 1992, LÓPEZ *et al*., 2015; SARATALE *et al*, 2021).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de Pseudomonas aeruginosa com grânulos intracelulares

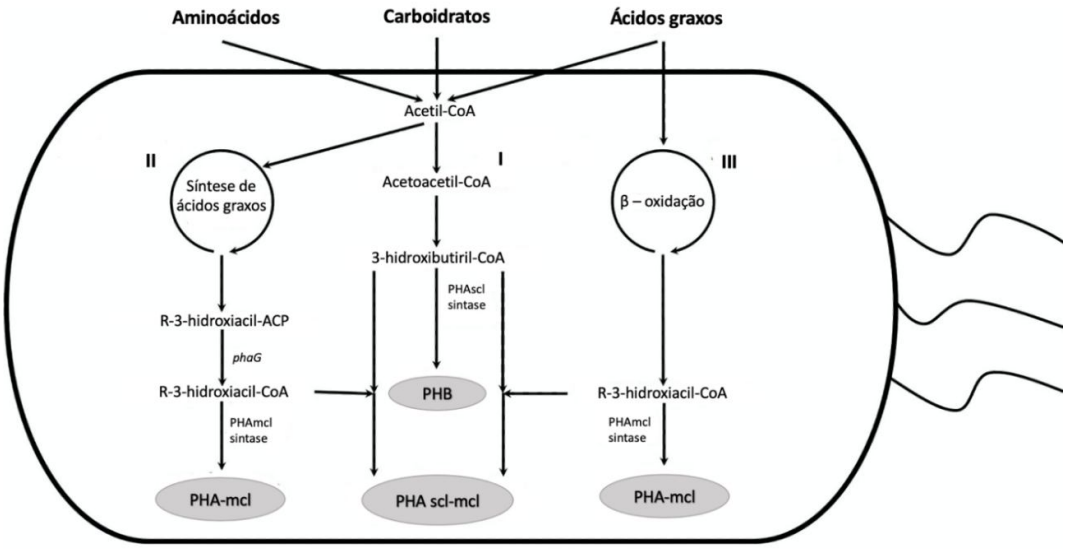


Fonte: (REHM, 2003)

De maneira geral, diferentes vias metabólicas (Figura 22) podem ser utilizadas para produzir os precursores de PHA, dependendo do microrganismo e da fonte de carbono (KNIEWEL *et al*., 2019). Poli-3-hidroxibutirato (PHB) é o PHAscl mais conhecido, pode ser produzido a partir de moléculas de acetil-CoA. Tanto PHAscl como PHAmcl são produzidos com a polimerização de 3-hidroxiacil-CoA, polimerizados por uma enzima PHA sintase (*pha*C) (CHEN *et al*., 2016). As propriedades do polímero dependem do tipo de *pha*C expresso pelo microrganismo, da fonte de carbono fornecida e da via metabólica utilizada para conversão da fonte de carbono em precursores para a produção de PHA (REHM, 2003; SUDESH *et al*., 2000; LU *et al*., 2009).

Em *Pseudomonas*, por exemplo a principal via para a produção de PHAmcl partir de ácidos graxos é a β-oxidação (LU *et al*., 2009). Através da síntese *de novo* de ácidos graxos, a glicose ou glicerol são metabolizados a acetil-CoA, que na via de biossíntese de ácidos graxos pode gerar os esqueletos carbônicos que serão polimerizados em PHAmcl (SUDESH *et al*., 2000; PRIETO *et al*., 2007; SHARMA *et al*., 2012). Uma vez que, na biossíntese de ácidos graxos são gerados acils ligados ao ACP, a ação de uma ACP-CoA transacilase (PhaG) é necessária para gerar os 3-hidroxiacil-CoA (REHM *et al*., 1998).

Figura 22 - Três principais vias metabólicas para a produção de PHA: (I) Acetoacetil-CoA, (II) Síntese de ácidos graxos e (III) ß-oxidação.



Adaptado de CHEN *et al*., 2016.

PHAs além de serem importantes para os próprios microrganismos que os produzem, sendo úteis em estratégias de sobrevivência (LÓPEZ *et al*., 2015), apresentam características que despertam interesse em estudos que abordam diferentes aplicações biotecnológicas para a solução de problemas ambientais. Dentre as propriedades físicas apresentadas pelos PHAs destaca-se a semelhança aos plásticos sintetizados a partir de derivados fósseis, como polietileno e polipropileno e sua biodegradabilidade. A biodegradação dos PHAs depende de inúmeros fatores, podendo demorar desde sete semanas até alguns meses (RUDNIK, 2013). Além disso, podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, podem apresentar biocompatibilidade com células e tecidos e apresentam uma grande diversidade estrutural, portanto oferecem uma alternativa ecologicamente favorável na substituição de plásticos industriais (PRIETO *et al*., 2014; SACCO, 2015).

Diante dos impactos causados pelo uso do plástico derivado do petróleo e de uma provável crise econômica causada pelo aumento de preço do petróleo, muitas empresas no mundo todo, inclusive no Brasil investiram na produção de PHA a partir de 1980 (CHEN, 2009). Neste contexto, diversas espécies bacterianas comumente são utilizadas industrialmente para a produção de PHA: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Aeromonas hydrophyla* e *Bacillus* spp., para produção de PHB e *Pseudomonas putida* e *P. oleovorans* para PHA de cadeia média, entre outras espécies modificadas geneticamente (CHEN, 2009).

No entanto, a difusão da aplicação deste polímero é limitada pelos altos custos da sua produção. Para tornar a produção em larga escala de PHA viável, minimizar os custos da produção, diferentes fontes de carbono mais baratas e renováveis, como resíduos originados de processos industriais têm sido testadas (SARATALE *et al*., 2021). Portanto, bactérias selvagens com o potencial de produção de PHA a partir substratos mais baratos, como por exemplo, o glicerol e óleos vegetais são desejáveis (SHARMA *et al*., 2012; SATHIYANARAYANAN *et al*., 2017; DE PAULA *et al*. 2017a, 2017b).

O glicerol é o principal subproduto do processo industrial para a obtenção de biodiesel, compondo cerca de 10% deste resíduo (PACHAURI & HE, 2006; SARATALE *et al*., 2021). Considerando a alta produção mundial de biodiesel, da qual o Brasil foi responsável por 13,2% em 2020 (BRITISH PETROLEUM, 2021) e que algumas espécies de bactérias são capazes de produzir PHA e biossusfactantes

a partir de glicerol, o uso deste substrato como fonte de carbono para a produção dessas biomoléculas para diminuir os custos de produção demonstra ser uma estratégia promissora. (DA SILVA *et al*., 2009; DE PAULA *et al*., 2017a, 2017b).

Espécies do gênero *Pseudomonas* são intensamente estudadas devido ao seu potencial de produção de PHA, sendo que PHAmcl é produzido principalmente por espécies deste gênero (CIESIELSKI *et al*., 2010; SHARMA *et al*., 2012). *P. putida* KT2440 e GPO1 (anteriormente descrita como *P. oleovorans*) são exemplos de linhagens que são bastante estudadas pelo seu potencial de produção de PHAmcl (PRIETO *et al*., 2016).

2.2 Ramnolipídeos

Os ramnolipídios são os biossurfactantes mais comumente estudados devido as suas propriedades tensoativas e emulsificantes. São amplamente estudados para fins biotecnológicos, pois podem ser empregados como alternativa ecológica aos surfactantes sintéticos. Além disso, são biodegradáveis, podem apresentar grande estabilidade em diferentes condições ambientais e possuem baixa toxicidade (ABDEL-MAWGOUD, 2010).

Podem ser compostos por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a 3-hidroxiácidos e são produzidas por algumas espécies bacterianas do gênero *Burkholderia* e *Pseudomonas* como *P. chlororaphis, P. plantari, P. putida, P. fluorescens e P. aeruginosa* sendo esta última a mais estudada, apesar de ser um patógeno oportunista humano e animal (HORI *et al*., 2002; RANDHAWA *et al*., 2014, BEHRENS *et al*., 2016).

Os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são estudados para aplicação em diferentes áreas como descontaminação de áreas afetadas por derramamentos de óleos, remoção de metais tóxicos do solo, produção de cosméticos, entre outros (HORI *et al*., 2002). *P. aeruginosa* pode tanto acumular PHAs no interior das células quanto produzir ramnolipídeos extracelular a partir de vários substratos, inclusive glicerol (HORI *et al*., 2002; POBLETE-CASTRO *et al*., 2020).

Como os PHAs, os ramnolipídeos podem ser produzidos a partir de diferentes fontes de carbono, no entanto a utilização de óleos vegetais como de soja, canola e oliva, promovem melhores resultados de produtividade (SOBERÓN-CHAVEZ *et al*., 2005). De forma semelhante aos PHAs, a produção de ramnolipídeos tem como

fator limitante os custos para a produção e a produção simultânea de PHA e ramnolipídeos demonstra ser uma opção para a redução dos custos de produção (HORI *et al*., 2002).

2.3 O gênero Pseudomonas

Em 1894, o gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez, com base em características morfológicas por Migula em 1900 e até a data atual muitas espécies são descritas anualmente, atualmente, o gênero possui 269 espécies reconhecidas (PARTE *et al*., 2020).

O gênero *Pseudomonas* é um grupo heterogêneo, adaptável a diversos ambientes e apresentam uma resistência a diversos fatores ambientais já conhecidos. Devido a estas características, este grupo tem sido amplamente estudado em pesquisas para aplicações em processos biotecnológicos, como por exemplo, para a produção de PHAmcl e ramnolipídios (REHM, 2003; VOJTKOVA, 2015).

A utilização de *Pseudomonas* sp. além de chamar a atenção pela sua capacidade de produção de diferentes polímeros e sua plasticidade metabólica, torna o processo viável pois muitas espécies deste gênero são consideradas como ambientais e não patogênicas para humanos e animais (PRIETO *et al*., 2016).

Em *Pseudomonas* spp., duas vias metabólicas principais são bem conhecidas para a produção de PHAmcl (i)Beta-oxidação, quando substratos estruturalmente relacionados aos PHAs, como os ácidos graxos, são utilizados como única fonte de carbono, em que os produtos intermediários são convertidos em 3-hidroxialcil-CoA; (ii) síntese de ácidos graxos *de novo*, na qual substratos não relacionados estruturalmente aos como carboidratos e glicerol acetato, etanol, frutose, glicose, gluconato e glicerol podem ser oxidados a acetil-CoA e canalizados para a formação de PHA pela síntese *de novo* (PRIETO *et al*., 2016; SHARMA *et al*., 2020). A polimerização do PHA em *Pseudomonas* é modulada por uma phaC classe II, responsável pela formação de PHAmcl (CHEK *et al*., 2019).

P. *putida* e *P*. *aeruginosa* são exemplos muito conhecidos de espécies do gênero *Pseudomonas* comumente estudadas para aplicação biotecnológica.

P. *putida*, conhecida pelo seu potencial de produção de PHA, pode apresentar uma grande diversidade de aplicações industriais (KANG, 2017). Por

exemplo, *P*. *putida* KT2440 é considerada um modelo nas pesquisas de produção de PHAs, já que apresenta um metabolismo versátil e conhecido, pode colonizar uma grande diversidade de ambientes (PRIETO, 2015). Em *P*. *putida* o tipo de fonte de carbono oferecido na produção de PHA pode afetar o seu metabolismo. Por exemplo, a síntese de PHA a partir de ácidos graxos, que são estruturalmente relacionados aos PHAs, ocorre principalmente na fase de crescimento exponencial, enquanto quando utilizada fontes de carbono como carboidratos e glicerol, uma fase de crescimento celular é necessária antes que as células se envolvam na produção de PHA (PRIETO *et al*., 2016). Desta forma, acredita-se que a condição de fornecimento de uma fonte de carbono em excesso e limitação de um nutriente como nitrogênio seja necessária somente para a segunda situação (PRIETO *et al*., 2016).

P. *aeruginosa* é capaz de produzir compostos surfactantes que diminuem a tensão superficial da água e são emulsificantes, conhecidos como ramnolipídios. Esses compostos podem utilizados industrialmente para a remediação de contaminação ambiental (WILD *et al*., 1997).

A versatilidade de metabolismo de *Pseudomonas* confere a esse grupo grande vantagem de adaptação e a variedade de biopolímeros e compostos produzidos devem ser mais bem explorados para aplicações biotecnológicas visando a resolução de problemas ambientais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial de produção de PHA e ramnolipídeos a partir de bactérias isoladas em canídeos silvestres.

3.2 Específicos

- Verificar a disponibilidade de espécies conhecidas por apresentarem potencial de produção de PHA ou ramnolipídeos na coleção de microrganismos de canídeos silvestres estabelecida;
- Realizar ensaios em agitadores rotativos utilizando-se diferentes fontes de carbono de baixo custo para avaliação do potencial de produção de PHA e ramnolipídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados analisados

Os isolados bacterianos utilizados nesta etapa são provenientes do estudo da diversidade de bactérias em canídeos silvestres explorado no Capítulo I. As espécies testadas foram selecionadas de acordo com os relatos na literatura sobre a capacidade de produção de PHA e ramnolipídeos. Portanto, inicialmente, oito isolados bacterianos foram selecionados para os testes de verificação de produção de PHA e ramnolipídeos: seis isolados identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, um isolado como *Pseudomonas* sp. e um isolado da espécie *Aeromonas hydrophila*.

4.2 Ensaio em agitadores rotativos para a produção de PHA

Os isolados selecionados foram inoculados em Agar LB e incubados em estufa à 36°C por 24 horas. Cinco colônias foram inoculadas em 50 mL de caldo Lysogeny Broth (LB, Difco) (BERTANI, 2004) e incubadas por 24 horas em agitador rotativo (150 rpm, 30 °C). Uma alíquota de 2,5 mL da cultura em caldo LB foi utilizada para inocular 25 mL de meio mineral (tabela 6) contendo uma das seguintes fontes de carbono em excesso: óleo de soja, glicerol, glicose, xilose, lactose, sacarose ou frutose. Alíquotas de 10 mL do cultivo em LB foram separadas para a determinação da massa seca celular e teor de PHA acumulado ao final do cultivo. As células inoculadas nos meios minerais mínimos contendo as diferentes fontes de carbono em excesso foram cultivadas por 72 horas e o pH, massa seca celular, quantidade e composição de PHAs foram determinados.

Tabela 6 - Composição dos meios de cultura para ensaios em agitador rotativo

(continua)

Meio Mineral Mínimo	
Fonte de carbono	15g/L
$(NH_4)\ SO_4$	1g/L
Na_2HPO_4	3,5g/L
KH_2PO_4	1,5g/L

(conclusão)

Soluções	
$MgSO_4.7H_2O$ (20%)	1mL/L
$CaCl_2.2H_2O$ (1%)	1mL/L
Citrato férrico amoniacal (6%)	1mL/L
Solução de elementos traços	1mL/L

Solução elementos traços	
H_3BO_3	0,3g/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,2g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0,1g/L
$MnCl_2.4H_2O$	30mg/L
$NaMo_2.2H_2O$	30mg/L
$NiCl_2.6H_2O$	20mg/L
$CuSO_4.5H_2O$	10mg/L

4.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Antes de dar início aos testes em biorreator, o isolado bacteriano selecionado foi testado quanto à sensibilidade aos antimicrobianos para garantir a segurança na manipulação e possível aplicação biotecnológica. Os testes foram realizados através da técnica de difusão em disco em Agar, descrita por BAUER, *et al.* (1966), e os antibióticos testados foram os preconizados para as espécies bacterianas, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018): sulfametoxazol + trimetoprim, amicacina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, imipenem e norfloxaxina. Apenas isolados sensíveis a mais de 90% dos antibióticos testados foram selecionados.

4.4 Ensaios em biorreator

O microrganismo que apresentou resultados mais interessantes nos experimentos em agitador rotativo utilizando diferentes fontes de carbono foi selecionado para o cultivo em biorreator para produção de PHA. A cultura em

batelada foi realizada em biorreatores EZ (*Applikon*) com capacidade de 5 litros e volume de trabalho de 2 litros. Os processos ocorreram em pH e temperatura controlados a 7.0 e 30°C, respectivamente. O isolado bacteriano selecionado foi inoculado em Agar LB e incubado por 24 horas a 36°C. Após o crescimento bacteriano, colônias isoladas foram transferidas para o meio mineral mínimo para o inoculo inicial, que foi incubado em agitador rotativo por 14 horas, a 30°C e 150rpm. Esta cultura foi submetida a centrifugação para remoção e lavagem do inóculo com solução de NaCl 0,8% e então, utilizada para inocular os cultivos em dois biorreatores contendo meios de cultura com diferentes limitações: fósforo ou nitrogênio e glicerol como fonte de carbono (Tabela 7). O pH foi controlado utilizando soluções de NaOH e H_2SO_4 (2.0 M). Para manter a concentração de glicerol entre 5 e 20g/L, foi utilizada uma solução de alimentação de 500 g/L. O fornecimento de ar foi controlado a 1L/min e o oxigênio dissolvido foi mantido acima de 30% de saturação através do aumento da agitação ou da vazão de ar. Periodicamente, foram colhidas amostras para analisar as concentrações de glicerol e biomassa e o teor e composição de PHA.

Tabela 7 - Composição do Meio Mineral para ensaio em biorreator

Componentes	Inóculo	Limitação em fósforo	Limitação em nitrogênio
Glicerol (g/L)	20	20	20
Na_2HPO_4 (g/L)	3,5	-	-
KH_2PO_4 (g/L)	1,5	0,3875	0,465
$(NH_4)2SO_4$ (g/L)	1	3,485	2,907
MgSO4.7H2O (g/L)	0,2	0,3105	0,3105
Citrato férrico amoniacal (g/L)	0,06	0,06	0,06
CaCl2.2H2O (g/L)	0,01	0,02	0,02
Elementos traços* (ml/L)	1	2	2
NaCl (g/L)	-	1	1

* Composição da solução elementos traços (g/L): H_3BO_3 (0,3); $CoCl.6H_2O$ (0,2); $ZnSO_4.7H_2O$ (0,1); $MnCl_2.4H_2O$ (0,03); $NaMoO_4.2H2O$ (0,03); $NiCl_2.6H_2O$ (0,02); $CuSO_4.5H_2O$ (0,01).

4.5 Metodologia analítica

4.5.1 Determinação da biomassa

Um volume de 10 mL das amostras, colhidas em duplicata, foi submetido à centrifugação a 10000 x g (4 °C, 10 minutos). Após a separação do sobrenadante, as células foram lavadas com uma solução de NaCl a 0,85% por duas vezes e submetidas a liofilização e a biomassa foi obtida por gravimetria em balança.

4.5.2 Determinação do pH

O sobrenadante de cada cultura, separado das células por centrifugação para a determinação da biomassa, foi analisado quanto ao pH em potenciômetro (Tecnal, modelo TEC2).

4.5.3 Determinação do teor e composição de PHA

Para determinar o teor e composição de PHA, 10 a 15 mg de células liofilizadas foram submetidas à reação de propanólise (RIIS & MAI, 1988), adicionando-se em tubo de vidro com tampa de rosca: 2 mL de solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L - padrão interno). Os tubos foram vigorosamente agitados e a reação foi incubada em banho a 100°C por 3 horas, agitando novamente após os primeiros 30 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foi adicionada água destilada (4 mL), os tubos foram submetidos a agitação em agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos e, após repouso, foi separada a fase orgânica inferior. Um volume de 0,2 µL da fase orgânica da reação de propanólise foi analisado após a injeção “split” (1:5) em cromatógrafo gasoso, (CG), Agilent 7890A, equipado com coluna HP1. Propil-ésteres de hidroxialcanoatos foram detectados através de detector por ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 300°C, respectivamente. Para a separação de propil-ésteres, foi utilizada a programação de temperatura das colunas: 100°C por 3 minutos, aumentando para 180°C (6°C min^{-1}), mantendo a temperatura por 5

minutos, com aumento posterior para 240°C (6°C min^{-1}). A vazão do gás nitrogênio, empregado como gás de arraste, foi de 1,0 $mL.min^{-1}$. Os polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *Pseudomonas* sp. LFM 046 a partir de diferentes fontes de carbono ou poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV) (*Aldrich*) foram utilizados como padrões externos para determinar a curva de calibração. O ácido benzoico foi utilizado como padrão interno.

4.5.4 Determinação da concentração de glicerol

O sobrenadante obtido através das amostras submetidas a centrifugação (10000 *x* g, 4 °C, 10 min) foram passadas por uma membrana filtrante (0.45-µm). Um volume de 20 µl foi injetado e analisado através de HPLC (Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com um detector de índice de refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japão) e uma coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 40 °C. A fase móvel foi de 5 mmol/L H_2SO_4 em um fluxo de 0,6 $mL.min^{-1}$. As soluções de glicerol foram preparadas em concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1, 2, 5, 10, 15, 20 g/L e utilizadas como padrões para a construção da curva de calibração.

4.5.5 Determinação da concentração de ramnolipídeos

Para a análise quantitativa e da composição dos ramnolipídeos produzidos, foram determinados os 3-hidroxiácidos e a ramnose presentes no sobrenadante. Um volume de 5 mL do sobrenadante submetido a liofilização e posteriormente, à reação de propanólise, conforme descrito no item 4.3.3 e analisado através de cromatografia gasosa. Para a detecção da ramnose, foi realizada uma reação de hidrólise, que consistia em adicionar 100µL de ácido sulfúrico (10mM) em 1mL do sobrenadante. A reação foi mantida em banho-seco por 5 horas à 98° C. Após o resfriamento dos tubos, adicionou-se 200µL de NaOH (10mM) e a análise foi realizada através de cromatógrafo líquido HPLC, conforme descrito para a determinação da concentração de glicerol. Para a determinação da curva padrão foram utilizadas soluções de ramnose nas concentrações de 0,1 a 1 g/L.

Como o processo de hidrólise pode interferir na quantificação da ramnose, foi realizado um cálculo para a correção dos valores, no qual considerou-se a porcentagem de ramnose recuperada após a hidrolise (84,2%) conforme descrito em trabalhos consultados (ALMEIDA, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio em agitador rotativo

5.1.1 Cultivo em meio mineral contendo glicose ou óleo de soja como fonte de carbono

Após 72 horas de cultivo, com glicose ou óleo de soja como única fonte de carbono, todos os isolados de *P. aeruginosa* (MA12B, MA32C, MA36F, MA58A, MA67D e MA70C) foram capazes de produzir PHA e ramnolipídeos (Tabelas 8 e 9). Estes isolados demonstraram uma capacidade de produção de ramnolipídeos maior que de PHA, principalmente na oferta de glicose como fonte de carbono. Estes isolados apresentaram valores de ramnolipídeos que variaram entre 1300 e 2100 mg/L, sendo muito maiores aos encontrados em *P. aeruginosa,* relatados em estudos anteriores, que podem produzir PHA e ramnolipídeos simultaneamente, demonstrando um acúmulo de PHA correspondente a 23% da massa seca celular e 298 mg/L de ramnolipídeos (HORI *et al*., 2002) e são similares aos de *P. aeruginosa* LFM634, que já demonstrou valores de produção de ramnolipídeos a partir de glicose, frutose ou glicerol acima de 2000 mg/L. O 3-hidroxidecanoato (3HD) foi o principal constituinte, representando mais de 60 mol%, semelhante ao que foi observado para outras *Pseudomonas* (ALMEIDA, 2012).

O isolado pertencente à espécie *A. hydrophila* não apresentou produção detectável de ramnolipídeos, entretanto foi capaz de produzir um polímero de PHA composto por 3-hidroxibutirato (3HB) e 3-hidroxihexanoato (3HHx) a partir de óleo de soja como fonte de carbono (Tabelas 10 e 11), como já relatado anteriormente em outros isolados de *Aeromonas* spp. (KOBAYAHI *et al*. 1994; DOI *et al*., 1995).

A produção simultânea desses dois compostos por *P. aeruginosa* tem sido bem estudada pelo potencial de redução de custos de produção, por outro lado a fonte de carbono utilizada pode ser um fator limitante, por exemplo, a glicose que quando utilizada por determinadas espécies bacterianas pode promover a acidificação do meio, inibindo o crescimento e produção de PHA, podendo explicar os baixos índices de produção de PHA por *P. aeruginosa* HORI *et al*., 2002).

Os ácidos graxos nos ramnolipídeos produzidos são compostos principalmente por 3-hidroxidecanoato, correspondendo a mais de 75% dos 3HAs. A

proporção 3HA/ramnose foi maior que 1,0 para algumas linhagens, o que indica que foi produzida uma mistura de di e mono-ramnolipídeos. Uma proporção maior que 2,0, também observada para algumas linhagens, demonstra que houve uma quantidade expressiva de 3-hidroxialcano-alcanoloxi (3HAA) nos ramnolipídeos produzidos. A capacidade de linhagens de *P. aeruginosa* estudadas neste trabalho produzirem ramnolipídeos com as mesmas características foi amplamente descrita na literatura (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al*., 2005). *P. aeruginosa* MA32C produziu um ramnolipídeo contendo quantidades de ramnose maiores que 3HAA (Tabela 11). Esta composição é característica de di-ramno-mono-lipídeos, porém estes homólogos foram observados apenas em condições específicas como em cultivos utilizando naftaleno como fonte de carbono (DÉZIEL *et al*., 1999).

O isolado MA09B (*Pseudomonas* sp.) não apresentou crescimento a partir de óleo de soja e não produziu ramnolipídeos em qualquer dos cultivos. Entretanto apresentou o melhor resultado de produção de PHA a partir de glicose, quando comparado aos resultados dos outros isolados testados neste trabalho (Tabela 8), produzindo uma biomassa de 3,0 g/L, sendo 19,4% de PHAmcl, composto principalmente por 3HD (70 mol%) e 3HDDΔ_5 (12 mol%), mas também foram detectados 3HHx, 3HO e 3HDD em menores quantidades (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção de PHA em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono

Isolados bacterianos	MSC (g/L)	pH final	Composição de PHA (mol%)						PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Pseudomonas sp. MA09B	3.07±0.10	6,17	-	0.77±0.05	9.75±0.24	69.42±0.98	7.57±0.26	12.49±0.42	23.47±3.97
P. aeruginosa MA12B	0.29±0.01	6,18	-	-	-	67.98±3.33	-	32.02±3.33	7.34±1.21
P. aeruginosa MA32C	0.66±0.00	6,08	-	-	4.16±0.87	65.01±3.31	11.05±0.12	19.78±2.57	7.82±2.96
P. aeruginosa MA36F	1.73±0.07	4,72	-	-	2.80±0.15	54.62±0.34	16.02±0.16	26.56±0.04	6.05±0.51
P. aeruginosa MA58A	1.37±0.03	6,14	-	1.39±0.06	8.06±1.07	58.12±1.19	13.13±0.68	19.29±1.52	8.82±0.03
P. aeruginosa MA67D	0.85±0.01	6,21	-	-	3.69±0.34	62.42±2.87	16.13±0.63	17.77±1.89	13.15±0.16
P. aeruginosa MA70C	1.92±0.04	6,26	-	-	3.30±0.64	50.49±0.27	7.01±0.04	39.21±0.33	4.54±0.25
A. hydrophila MA58B	1.76±0.08	6,64	100.00	-	-	-	-	-	<1.00

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HB - 3-hidroxibutirato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO - 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

Tabela 9 - Produção de ramnolipídeos em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono

Isolados bacterianos	Ramnose (mg/L)	3HAA (mg/L)	Ramnolipídeo (mg/L)	Composição de 3HA (mol%)					3HAA/Ram (mol/mol)
				3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Pseudomonas sp. MA09B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa MA12B	1052.8±87.3	910.2±77.2	1963.0±164.5	-	-	100.00	-	-	1.55±0.00
P. aeruginosa MA32C	1072.9±155.0	850.3±2.0	1923.3±157.0	-	4.13±0.59	88.84±0.33	6.08±0.34	0.95±0.08	1.43±0.20
P. aeruginosa MA36F	1054.4	639.7	1694.1	-	2.70	88.12	1.41	7.77	1.08
P. aeruginosa MA58A	616.7±121.2	1018.3±87.3	1635.0±208.4	-	5.62±0.45	88.14±0.37	6.24±0.08	-	2.99±0.34
P. aeruginosa MA67D	565.0±83.0	817.6±55.4	1382.6±27.6	-	2.51±1.12	90.01±4.57	6.28±2.70	1.20±0.75	2.62±0.56
P. aeruginosa MA70C	799.7±222.7	1300.8±5.0	2100.4±217.7	-	2.94±0.38	77.41±0.64	12.95±0.38	6.70±0.31	2.99±0.85
A. hydrophila MA58B	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HB - 3-hidroxibutirato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO - 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

Tabela 10 - Produção de PHA em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono

Isolados bacterianos	MSC (g/L)	pH final	Composição de PHA (mol%)						PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Pseudomonas sp. MA09B	0.27±0.01	7.11	-	-	-	55.53	-	44.47	<1.0
P. aeruginosa MA12B	2.11±0.04	6.47	-	1.30±0.13	13.77±0.99	47.02±4.44	-	37.91±5.56	4.19±0.20
P. aeruginosa MA32C	2.33±0.06	6.45	-	-	9.62±092	61.58±2.15	10.43±0.34	18.37±0.89	8.08±2.53
P. aeruginosa MA36F	2.01±0.01	6.63	-	1.36±0.01	6.46±0.26	52.52±0.57	6.38±0.10	33.29±0.92	3.97±1.09
P. aeruginosa MA58A	2.34±0.04	6.33	-	1.37±0.01	10.75±2.88	49.15±3.18	13.12±5.80	25.61±6.10	7.15±2.82
P. aeruginosa MA67D	2.47±0.11	6.39	-	1.06±0.08	15.18±0.09	52.85±3.66	11.18±1.76	19.73±1.74	9.33±1.20
P. aeruginosa MA70C	2.05±0.16	6.52	-	-	16.64±1.20	52.53±6.34	5.30±3.83	25.52±1.31	4.77±0.12
A. hydrophila MA58B	0.96±0.08	6.98	98.04±0.49	1,96±0.49	-	-	-	-	6.32±0.14

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HB - 3-hidroxibutirato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO - 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

Tabela 11 - Produção de ramnolipídeos em ensaios em agitador rotativo após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono

Isolados bacterianos	Ramnose (mg/L)	3HAA (mg/L)	Ramnolipídeo (mg/L)	Composição de 3HA (mol%)					3HAA/Ram (mol/mol)
				3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Pseudomonas sp. MA09B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa MA12B	23.9±1.1	55.4±1.8	79.3±0.7	-	-	100	-	-	4.15±0.32
P. aeruginosa MA32C	433.8±137.5	96.8±14.6	530.6±123.0	-	-	100	-	-	0.43±0.20
P. aeruginosa MA36F	20.8±3.27	59.0±21.5	79.9±18.2	-	-	100	-	-	5.29±2.68
P. aeruginosa MA58A	37.1±13.1	46.2±10.3	83.2±23.4	-	-	100	-	-	2.29±031
P. aeruginosa MA67D	56.4±12.0	90.9±5.5	147.2±17.6	-	-	100	-	-	2.94±0.45
P. aeruginosa MA70C	57.1	175.7	232.8	-	2.03	77.26	12.43	8.28	5.43
A. hydrophila MA58B	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HB - 3-hidroxibutirato, 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO - 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

5.1.2 Cultivo em meio mineral contendo diferentes carboidratos como fonte de carbono

Conforme descrito no primeiro capítulo deste trabalho, o isolado MA09B foi inicialmente identificado como *P. monteilii* através da técnica de MALDI-TOF, porém as análises taxonômicas e fenotípicas demonstraram uma distância filogenética menor com a espécie *P. asiatica*. Pela ausência de relatos na literatura que reportem a produção de PHA por ambas as espécies e considerando os resultados do primeiro ensaio em agitador rotativo, além da versatilidade metabólica de espécies do gênero *Pseudomonas* para a produção de PHA mcl, selecionamos *Pseudomonas* MA09B para novos ensaios utilizando fontes de carbono diferentes e repetição do ensaio com glicose. Neste conjunto de experimentos, o isolado *Pseudomonas* sp. LFM046 foi utilizado como referência, pois possui bons resultados de produção de PHA a partir de carboidratos, podendo acumular mais que 60% de PHA em relação a biomassa (DINIZ *et al*., 2004) e óleos vegetais (SILVA-QUEIROZ *et al*., 2009). Desta forma, MA09B e LFM046 foram submetidas aos cultivos em meio mineral mínimo contendo: glicose, glicerol, xilose, lactose, sacarose ou frutose como única fonte de carbono.

Ambos os isolados testados não produziram PHA a partir de sacarose, lactose ou xilose. MA09B produziu PHA a partir de glicose, glicerol e frutose, que representou um percentual de massa seca de 12%, 31% e 28%, respectivamente. O polímero produzido foi principalmente composto por 3HD, uma composição típica de PHAmcl produzidos por outras linhagens de *Pseudomonas* (DINIZ *et al*., 2004; SILVA-QUEIROZ *et al*., 2009; CARDINALI-REZENDE *et al*., 2020) (Tabela 12).

Como esperado, LFM046 foi capaz de produzir PHAmcl a partir de glicose e frutose, representando um percentual da massa seca celular de 32% e 11%, respectivamente, de um polímero composto principalmente por 3HD (Tabela 13). LFM046, linhagem testada em diversos trabalhos anteriores, já apresentou capacidade de acumular até 60% de PHA, utilizando-se glicose e frutose em ensaios em agitador rotativo, podendo produzir 2,3 g/L de PHA (DINIZ *et al*., 2004, KAWAI, 2013) e até 34% utilizando óleos vegetais, entretanto não foi capaz de produzir PHA a partir de glicerol (SILVA-QUEIROZ, *et al*., 2009). O PHAmcl produzido por este mesmo isolado a partir de glicose e/ou frutose é composto principalmente de 3HD (cerca de 60 mol%), HO (cerca de 30 mol%) e 3HHX, 3HDD e 3HDDΔ5 em menores quantidades (KAWAI, 2013).

Tabela 12 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. MA09B em ensaios em agitadores rotativos após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH final	Composição de PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Glicose	4.31±0.47	6,17	0.57±0.11	7.96±2.41	79.91±2.18	7.29±1.75	4.27±1.90	19.86±13.20
Glicerol	5.27±0.47	7,11	1.20±0.06	10.02±4.52	79.27±7.76	5.36±1.29	4.16±2.27	40.16±18.46
Xilose	0.35±0.07	6,18	-	-	-	-	-	<1.00
Lactose	0.31±0.11	6,47	-	-	-	-	-	<1.00
Sacarose	0.24±0.02	6,08	-	-	-	-	-	<1.00
Frutose	4.51±0.09	6,45	1.19±0.14	14.85±0.35	68.65±0.53	7.34±0.01	7.98±0.03	28.46±2.16

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO – 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

Tabela 13 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 em ensaios em agitadores rotativos após 72 horas de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH final	Composição de PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HDDΔ_5	
Glicose	3.30±0.15	6,14	-	26.20±5.54	73.80±5.54	-	-	36.73±27.11
Glicerol	0.41±0.04	6,33	-	-	-	-	-	<1.00
Xilose	0.24±0.02	6,64	-	-	-	-	-	<1.00
Lactose	0.22±0.04	6,98	-	-	-	-	-	<1.00
Sacarose	0.28±0.01	6,21	-	-	-	-	-	<1.00
Frutose	2.33±0.09	6,39	2.10±0.14	33.04±0.57	55.19±0.39	6.73±0.37	2.94±0.01	10.72±0.68

Média ± Desvio Padrão. -: não detectado. MSC - Massa seca celular. 3HHx - 3-hidroxihexanoato, 3HO – 3-hidroxioctanoato, 3HD-3-hidroxidecanoato, 3HDD - 3-hidroxidodecanoato, 3HDDΔ_5 - 3- hidroxi-5-dodecenoato

As análises para a inferência taxonômica de MA09B, descritas no capítulo I, indicam que é possível que este isolado seja uma nova espécie, diretamente relacionada com as espécies *P*. *asiatica*, *P*. *monteilii*, *P*. *entomophila*, *P*. *plecoglossicida* e *P*. *tawianensis*. Estas espécies são filogeneticamente próximas a *P*. *putida*, uma espécie comumente estudada para a produção de PHA a partir de diferentes fontes de carbono, apresentando como principal componente dos polímeros produzidos a partir de glicose, 3HD (cerca de 60 mol%), porém também são observados, em menor quantidade, 3HO e 3HDD (SILVA-QUEIROZ, *et al*., 2009; SHARMA *et al*., 2012). Ao contrário de MA09B, *P*. *monteilii*, espécie filogeneticamente próxima a MA09B, é capaz de produzir PHA a partir de óleos vegetais, o que demonstra mais uma característica diferencial entre as espécies (SHARMA *et al*., 2020). *P*. *mosselii*, outra espécie diretamente relacionada a *P*. *putida*, em ensaios em agitadores rotativos pode acumular até 28 % da massa seca celular de PHA a partir de e óleo de soja, chegando a uma produtividade de PHA de 13 mg/L.h. O polímero de PHA é composto principalmente por 3HO (LIU *et al*., 2018).

Não existem muitos estudos relacionando a conversão de glicerol em PHAmcl por *Pseudomonas* sp. Sabe-se que espécies como *P*. *mediterrânea*, *P*. *mosselii*, *P*. *corrugata* e *P*. *putida* já atingiram um valor de PHA em relação a massa seca celular de 61, 51, 42 e 9%, respectivamente (SHARMA *et al*., 2012; LIU *et al*., 2018; LICCIARDELLO *et al*., 2019). Portanto, para explorar melhor o potencial de produção de PHA deste novo isolado de *Pseudomonas* sp. a partir de uma fonte promissora para a diminuição dos custos de aplicação industrial, conduzimos ensaios em biorreator com o isolado MA09B.

MA09B foi testado quanto à sensibilidade aos antimicrobianos preconizados pelo CLSI, tendo sido sensível a todos, exceto a sulfametoxazol + trimetropim, entretanto, algumas espécies de *Pseudomonas* isoladas no ambiente podem ser naturalmente resistentes a esse antibiótico (ASIF *et al*., 2016).

5.2 Ensaio em biorreator

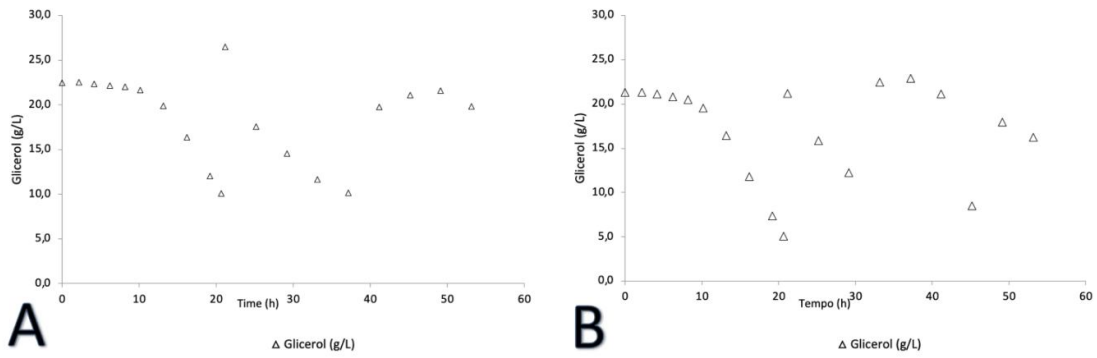
Diante da imensa diversidade de condições de cultivo, espécies bacterianas testadas, metodologia analítica adotada em estudos disponíveis para consulta, não existe um padrão esperado de resultados e qualquer comparação deve ser realizada

com cautela. Diante disso, alguns estudos com espécies correlatas à analisada neste trabalho, bem como ensaios em condições similares serão citados nesta discussão.

Pseudomonas sp. MA09B, isolada em cavidade oral de um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), foi submetida a culturas em batelada em biorreatores para avaliar seu potencial para produção de PHA em escala industrial. Como fonte de carbono, o glicerol foi utilizado, já que se trata de um subproduto da produção de biodiesel e pode ser utilizado por *Pseudomonas* spp. para a produção de uma variedade de compostos (POBLETE-CASTRO *et al.*, 2020). As culturas realizadas tiveram limitação de nitrogênio ou fósforo, portanto, a quantidade de ambos os nutrientes foram os primeiros a se esgotarem na cultura em batelada (Tabela 7).

O glicerol foi adicionado à cultura a partir de uma solução concentrada (500g/L), sempre que a concentração da cultura chegava próxima de 5 g/L, evitando assim, sua limitação e esperando-se manter, após a alimentação, uma concentração de aproximadamente 20 g/L (Figura 23). O oxigênio foi mantido acima de 30% da saturação do meio com o intuito de evitar a limitação do crescimento da cultura.

Figura 23 – Concentração de glicerol durante as culturas em biorreatores.



A. Cultura com limitação de Fósforo. B. Cultura com limitação de Nitrogênio.

Foram observadas três fases diferentes nas culturas. Na primeira fase foi observado um crescimento exponencial entre 08 e 16 horas no cultivo com limitação de fósforo e 04 e 13 horas no cultivo com limitação de nitrogênio. Algumas espécies como de *P. putida* são capazes de acumular PHA em condições em que haja excesso ou limitação de fonte nitrogênio, no entanto o acúmulo de PHA é maior em

ensaios com nitrogênio como fator limitante (SHARMA *et al*., 2012). Neste caso, observamos que a duração da fase lag no cultivo com limitação de nitrogênio foi menor. Nesta mesma fase não houve uma produção expressiva de PHA. Foi verificado uma velocidade específica de crescimento nas culturas com limitação de fósforo e nitrogênio correspondente a 0,29±0,02 e 0,33±0,05 h^{-1}, respectivamente. Esses valores são similares aos de *P. chlororaphis* que, em ensaio em biorreator utilizando glicerol como fonte de carbono, atingiu uma velocidade específica de crescimento de 0,24 h^{-1}, (DE MENESES *et al*., 2020). Não houve diferenças significativas entre as taxas específicas de crescimento de ambas as culturas, pois nesta fase da cultura, o meio não apresenta uma limitação de crescimento por nutrientes.

A terceira fase, correspondente a fase estacionária de crescimento, iniciou-se em aproximadamente 37 horas de cultivo em ambas as condições e não foi verificada a produção de PHA nessa fase de crescimento, o que normalmente é observado em bactérias produtoras de PHA. E estudos anteriores, como por exemplo em *P. putida*, relatam a produção de PHA após a fase de crescimento celular quando uma fonte de carbono como glicerol é utilizada (LEE, 1996; PRIETO *et al*., 2016). Entretanto, o acúmulo de PHA pela linhagem MA09B ocorreu principalmente após a fase de crescimento exponencial, quando o nutriente limitante ainda não havia se esgotado, mas o acúmulo de PHA parou após o esgotamento do nutriente limitante (Figura 24).

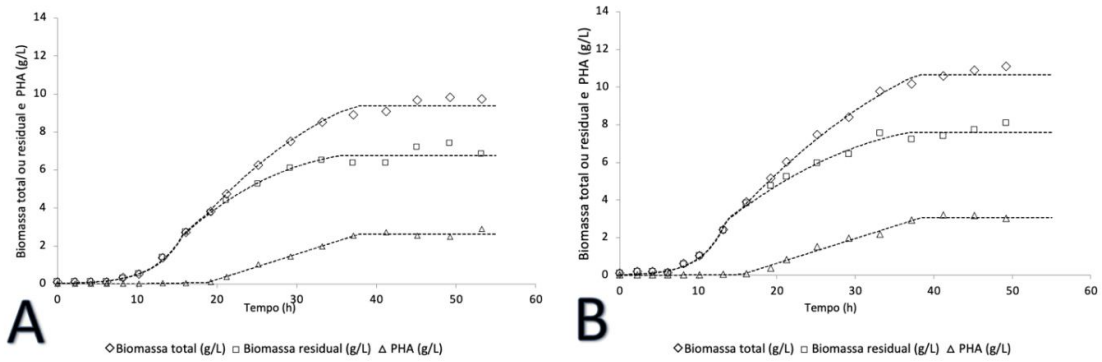
A fase de crescimento entre a fase exponencial e estacionária, considerada como uma segunda fase foi bastante relevante. A biomassa celular alcançou valores mais que duas vezes maiores no início da fase estacionária, quando comparado aos valores do final da fase exponencial. Isso sugere que a constante de saturação (valor de Ks) para as fontes de nitrogênio (amônia) e fósforo (fosfato) são relativamente altas. As taxas de produção de PHA foram constantes e correspondem a 133,5 e 132,0 mg/L.h para as culturas com limitação de fósforo ou nitrogênio, respectivamente.

Considerando que a biomassa residual está aumentando, a taxa específica de formação do produto foi de 35,6-19,8 e 36,2-17,4 mg/g.h respectivamente para as culturas com limitação de fósforo e nitrogênio, respectivamente. Embora as velocidades específicas de crescimento sugiram um bom desempenho para um processo de produção de PHA, quando comparado com trabalhos anteriores, as

taxas especificas de formação do produto ainda são modestas e devem ser melhoradas para um desempenho adequado em escala industrial.

O teor de PHA alcançou aproximadamente 30% da massa seca celular em ambas as culturas, atingindo um valor de PHA de 2,9 e 3,0 g/L para limitação em fosforo e nitrogênio, respectivamente (figura 24). Em ensaio semelhante em biorreator com *P*. *chlororaphis*, utilizando glicerol como fonte de carbono o teor de PHA atingiu 19% da massa seca celular (DE MENESES *et al*., 2020).

Figura 24- Biomassa total, biomassa residual e produção de PHA por *Pseudomonas* sp. MA09B em culturas em biorreatores



A. Cultura com limitação de Fósforo. B. Cultura com limitação de Nitrogênio.

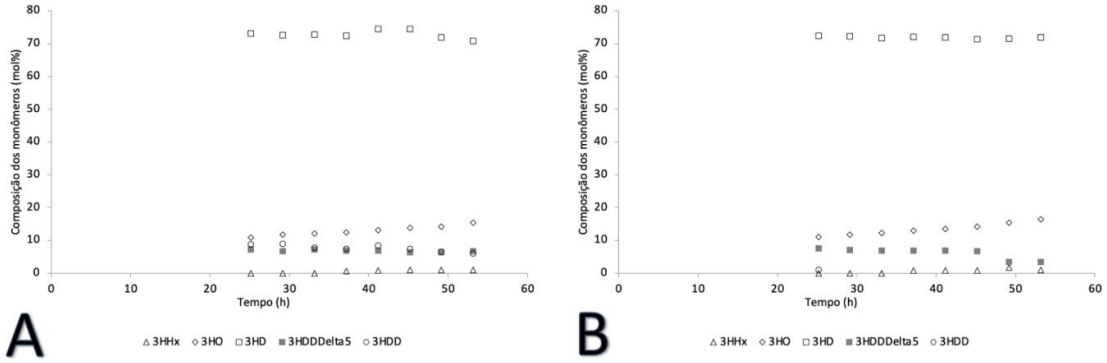
Uma composição típica de PHA contendo monômeros de cadeia média foi observada com a presença de 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal componente, correspondendo a aproximadamente 70% dos monômeros produzidos. 3-hidroxioctanoato (3HO) foi o componente secundário, representando entre 10 e 20% dos monômeros. 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxidodecanoato (3HDD) e 3-hidroxi-5-dodecenoato (3HDDΔ5) também foram detectados (figura 25).

Durante a fase de produção de PHA na cultura com limitação em fósforo, a biomassa residual e o rendimento de PHA a partir de glicerol ($Y_{Xr/Gli}$ e $Y_{PHA/Gli}$) foram, respectivamente, 0,15 e 0,21 g/g, correspondendo a um rendimento de biomassa total (CDW) a partir de glicerol ($Y_{X/Gli}$) de 0,36 g/g. Na cultura com limitação de nitrogênio, o desempenho metabólico foi menor e os valores de $Y_{Xr/Gli}$ e $Y_{PHA/Gli}$ foram de 0,14 e 0,12 g/g, respectivamente, correspondendo a um $Y_{X/Gli}$ de 0,26 g/g. Esses

números são compatíveis com uma excelente conversão de glicerol em biomassa celular e PHA, quando comparamos com o rendimento de PHAmcl a partir de glicerol ($Y_{PHA/Gli}$) de outras espécies do gênero *Pseudomonas*, cultivadas em condições semelhantes, que variam entre 0,01 e 0,13 g/g (DE MENESES *et al*., 2020; POBLETE-CASTRO *et al*., 2020).

A produção de PHAmcl apenas com limitação de crescimento pelos nutrientes, mas não completamente esgotados representa um grande desafio para explorar o potencial da *Pseudomonas* sp. MA09B para ser aplicado em processos industriais, uma vez que as condições de cultivo devem ser ajustadas para explorar as condições de fornecimento de nutrientes para o melhoramento da produção, além de minimizar a produção de biomassa celular e maximizar a produção de PHA. Cultivos contínuos são especialmente adequados para explorar esse potencial, pois nesses cultivos o crescimento e produção de PHA ocorre simultaneamente.

Figura 25 – Composição dos monômeros de PHA por *Pseudomonas* sp. MA09B em culturas em biorreatores



A. Cultura com limitação de Fósforo. B. Cultura com limitação de Nitrogênio.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, embora tenha avaliado apenas uma pequena porcentagem do total de isolados obtidos, isolados bacterianos *Pseudomonas aeruginosa* (MA12B, MA32C, MA36F, MA58A, MA67D e MA70C) produziram PHA e ramnolipídeos concomitantemente, e *Aeromonas hydrophila* produziu PHA.

Destacou-se o isolado MA09B, ainda que apresente sua inferência taxonômica indeterminada, necessitando de novos testes para afirmar tratar-se de uma espécie não descrita, demonstrou os melhores resultados para produção de PHA, alcançando um teor de PHA de aproximadamente 30% da biomassa celular a partir de glicerol como fonte de carbono em ensaios em biorreatores, com resultados promissores para futuros ajustes para aplicação em processos industriais.

Embora a produção de PHA tenha sido maior durante o crescimento, quando o fator limitante ainda não havia se esgotado, apresentou valores relevantes de conversão de glicerol em PHA. Se parâmetros nutricionais forem ajustados, este isolado possui potencial de ser um bom produtor de PHA a partir de uma fonte de carbono acessível.

Contudo, este trabalho demonstra que espécies bacterianas produtoras de PHAs e ramnolipídeos podem ser encontradas em amostras provenientes de animais silvestres, com imenso potencial a ser explorado para a prospecção de microrganismos com potencial para aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

ABAYASEKARA, L. M. *et al.* Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: A comparative study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, 2017.

ABDEL-MAWGOUD, A. M. *et al*. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol,** v. 86, p. 1323-1336, 2010.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The *rpo*B gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 2009.

AGUIRRE, A. A. Wild Canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites & vectors**, v. 2, 2009.

ALMEIDA, J. C. *et al.* Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous* - Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 1, p. 184-189, 2018.

ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípidio**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

ALTSCHUL, S.F. *et al*. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v 3, p. 403-10, 1990.

ALVES, C. D. B. T. *et al.* Mamastrovirus 5 detected in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*): Expanding wildlife host range of astroviruses. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 58, p. 36-43, 2018.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

AMBROSINI, Y. M. *et al.* The gut-brain axis in neurodegenerative diseases and relevance of the canine model: A review. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 1-14, June 2019.

ARENSKÖTTER, M.; BRÖKER, D.; STEINBÜCHEL, A. Biology of the metabolically

diverse genus *Gordonia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3195-3204, 2004.

ASIF, H. *et al.* Comparative genomics of an endophytic *Pseudomonas putida* isolated from mango orchard. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 2016.

BAUER, A. W. *et al*. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 36, p. 493-496, 1966.

BEHARRYSINGH, R. Myroides bacteremia: A case report and concise review. **IDCases**, v. 8, p. 34-36, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2017.02.012. Acesso em: 21 fev. 2020.

BEHRENS, B. *et al*. Rhamnolipid biosurfactant analysis using online turbulent flow chromatography- liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 1465, p. 90-97, 2016.

BEMIS, D. A. *et al.* Synergistic hemolysis between β-lysin-producing *Staphylococcus* species and *Rothia nasimurium* in primary cultures of clinical specimens obtained from dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 3, p. 437-441, 2014.

BERTANI, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. **J Bacteriol**. v.186, n. 3 p. 595-600, 2004.

BERTHOLD-PLUTA, A. *et al.* Microbiological quality of nuts, dried and candied fruits, including the prevalence of *Cronobacter* spp. **Pathogens**, v. 10, n. 7, 2021.

BOATH, J. M. *et al.* Polyphasic characterisation of *Cedecea colo* sp. nov., a new enteric bacterium isolated from the koala hindgut. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

BOEY, J. Y. *et al.* A Review of the Applications and Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) and Its Composites. **Polymers**, v. 13, n. 10, p. 1544, 2021.

BORSANELLI, A. C. *et al*. Dental biofilm and its ecological interrelationships in ovine periodontitis. **Journal of medical microbiology**, v. 70. n. 7, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1099/jmm.0.001396, 2021. Acesso em: 15 set. 2021.

BRANDÃO, E. M. V. *et al.* Wild and domestic canids and their interactions in the transmission cycles of trypanosoma cruzi and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian Cerrado. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-19, 2020.

BRICEÑO, C. *et al.* Ear mites, otodectes cynotis, on wild foxes (*Pseudalopex* spp.) in

chile. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, n. 1, 2020.

British Petroleum Company. **BP Statistical Review of World Energy,** London: British Petroleum Co, 2021.

BROOKE, J. S*. Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 2-41, 2012.

BRYAN, L. K. *et al. Rhodococcus equi* Infections in Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 159-163, 2017.

BYKOVA, N. *et al.* Pet-human gut microbiome host classifier using data from different studies. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1-14, 2020.

CANID SPECIALIST GROUP. Programa de conservação mamíferos do cerrado, 2021. Disponível em: https://www.canids.org/programa-de-conserva-ccedil-atilde-o-mam-iacute-feros-do-cerrado. Acesso em: 02 maio 2021.

CARDINALI-REZENDE, J. *et al.* The relevance of enzyme specificity for coenzymes and the presence of 6-phosphogluconate dehydrogenase for polyhydroxyalkanoates production in the metabolism of *Pseudomonas* sp. LFM046. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, 240-250, 2020.

CARVALHO, C. T. D; VASCONCELLOS, L. E. M. Disease, food and reproduction of the maned wolf: *Chrysocyon Brachyurus* (Illiger) (Carnivora, Canidae) in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 627-640, 1995.

CHASE, A. B. *et al.* Evidence for ecological flexibility in the cosmopolitan genus Curtobacterium. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-11, Nov. 2016.

CHEK, M. F. *et al.* PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1131-1141, 2019.

CHEN, G. Q.; JIANG, X. R.; GUO, Y. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 236-242, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.006. Acesso em: 29 set. 2020.

CHEN, X. F. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis for the identification of pathogenic microorganisms: A review. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 2021.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials

industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, 2009.

CHUN, J. L. *et al.* Difference of gut microbiota composition based on the body condition scores in dogs. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 239-246, 2020.

CIESIELSKI. S.; MOŻEJKO. J.; PRZYBYŁEK. G. The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 511-520, 2010.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. **CLSI document VET01-A4 and VET01-S2**, ed. 4, 2018.

CORREA, C. M. A.; PUKER, A.; ABOT, A. R. Impacts of Exotic Pasture Establishment on Dung Beetle Assemblages (Coleoptera: *Scarabaeidae*: *Scarabaeinae*) in the Brazilian Cerrado. **Environmental Entomology**, v. 49, n. 6, p. 1-10, 2020.

CURI, N. H. D. A. *et al.* Pathogens of wild maned wolves (Chrysocyon brachyurus) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 48, n. 4, p. 1052-1056, 2012.
CURI, N. H. D. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of Leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DABBOUSSI, F. *et al.* Pseudomonas mosselii sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 363-376, 2002.

DA SILVA, L. F & ALTERTHUM, F. Patrimônio biológico: obtenção, cultivo e manutenção de microrganismos de interesse me bioprocessos. *In*: ALTERTHUM, F. **Biotecnologia Industrial- Volume I Fundamentos**. São Paulo: Blucher, 2020. p. 179-192.

DE PAULA, F. C. *et al*. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated Pandoraea sp. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 2, p. 166-173, 2017a.

DE PAULA, F. C. *et al*. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from biodiesel by-product and propionic acid by mutante strains of *Pandoraea* sp. **Biotechnology Progress**, v. 33, p. 1077-1084, 2017b.

DÉZIEL, E. *et al.* Liquid chromoatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on mannitol

or naphthalene. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1440, p. 244-252, 1999.

DIAZ-DELGADO, J. *et al.* Endocarditis associated with *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 1, p. 283-286, 2015.

DIB, L. V. *et al.* Non-invasive sampling in Itatiaia National Park, Brazil: Wild mammal parasite detection. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-21, 2020.

DINIZ, S. C. *et al.* High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 51-69, 2004.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822-4828, 1995.

DOVJAK, P.; KROISSENBRUNNER, M.; IGLSEDER, B. Myiasis Absent Wohlfahrtiimonas Chitiniclastica Bacteremia in a Lung Cancer Patient - A Case Report. **European Journal of Medical Research**, p. 1-9, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s40001-021-00576-w. Acesso em: 28 set. 2021.

ELLIOTT, D. R. *et al.* Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005.

ELOMARI, M. *et al. Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 846-852, 1997.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 1, p. 208-227, 2019.

FENSKE, G. J. *et al.* Integration of culture-dependent and independent methods provides a more coherent picture of the pig gut microbiome. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 3, p. 1-10, 2020.

FERRAZ-ALMEIDA, R. & DA MOTA, R.P. Routes of Soil Uses and Conversions with the Main Crops in Brazilian Cerrado: A Scenario from 2000 to 2020. **Land**, v.10, n.11, p. 1135., 2021.

FERREIRA, T. S. P. *et al.* Pheno- and genotypic characterization of Pasteurella multocida isolated from cats, dogs and rabbits from Brazil. **Comparative**

Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 45, p. 48-52, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.02.004. Acesso em: 05 ago. 2020.

FERREIRA JUNIOR, R. S. *et al.* Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (Crotalus durissus terrificus) microbiota. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 999-1003, 2009.

FRANK, D. One world, one health, one medicine. **Can Vet J**, v. 49, p. 1063-1065, 2008.

FURTADO, M. M. *et al.* Exposure of Free-Ranging Wild Carnivores and Domestic Dogs to Canine Distemper Virus and Parvovirus in the Cerrado of Central Brazil. **EcoHealth**, v. 13, n. 3, p. 549-557, 2016.

GAMBINO, D. *et al.* Study on bacteria isolates and antimicrobial resistance in wildlife in Sicily, southern Italy. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2021.

GARCIA-MAZCORRO, J. F.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: A brief review. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 45, n. 2, p. 111-124, 2013.

GILIOLI, R.; SILVA, F. A. Frequency of parasites and Salmonella infection in captive maned-wolf, Chrysocyon brachyurus, kept in Zoos at the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 337-341, 2000.

GIRARD, L. *et al.* Reliable identification of environmental pseudomonas isolates using the rpod gene. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1-13, 2020.

GOMES, C. M. B. *et al*. Determinação de enterobactérias em mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, p.74-80, 2011.

GOMEZ, J. G. C. *et al*. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMILA, M. *et al.* Phylogenomics and systematics in Pseudomonas. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, Mar. 2015.

GOODMAN, A. L. *et al*. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 108, n. 15, p. 6252-6257, 2011.

GOOGLE, INC. Google Maps. Disponível em: https://goo.gl/maps/hrG1vXzUGSPKMaJx8/ Acesso em: 18 de setembro de 2021.

GRADY, E. N. *et al.* Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2016.

GRUETZMACHER, K. *et al.* The Berlin principles on one health - Bridging global health and conservation. **Science of the Total Environment**, v. 764, p. 1-4, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142919. Acesso em: 18 jul. 2021.

HANG, I. *et al.* Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

HEBERLE, H.; MEIRELLES, G. V.; DA SILVA, F. R.; TELLES, G. P.; MINGHIM, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics,** v. 16, n. 169, 2015.

HIERGEIST, A. *et al.* Analyses of intestinal microbiota: Culture versus sequencing. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 228-240, 2015.

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 73, 2001.

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 699-707, 2002.

HORNG, K. R. *et al.* Effects of preservation method on canine (Canis lupus familiaris) fecal microbiota. **PeerJ**, v. 2018, n. 5, p. 1-18, 2018.

ISAIAH, A. *et al.* Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-16, 2017.

IUCN. **Issues brief: Marine plastics**, 2018. Disponível em https://www.iucn.org/sites/dev/files/marine_plastics_issues_brief_final_0.pdf. Acesso em: 01 ago. 2021.

JAMIL, RADIA T.; FORIS, LISA A.; SNOWDEN, J. Proteus Mirabilis Infections. **StatPearls**, p. 1-4, 2020. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723046. Acesso em: 21 dez. 2020.

JECHALKE, S. *et al.* Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 536-545, 2014. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005. Acesso em: 26 jul. 2020.

JONES, K. E. *et al*. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990-993, 2007.

JUSI, M. M. G. *et al.* Molecular and serological detection of Leishmania spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 219-222, 2011.

KANG, D. K. *et al*. Production of polyhydroxyalkanoates from sludge palm oil using Pseudomonas putida S12. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 27, n. 5, p. 990-994, 2017.

KAWAI, L. A. **Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxialcanoatos por psedomonas sp. através da análise molecular e modificação genética.** 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p.111-120, 1980.

KNIEWEL, R.; LOPEZ, O. R.; PRIETO, M. A. Biogenesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. **Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes**, p. 457-481, 2019.

KOBAYASHI, G.; *et al.* Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by Aeromonas sp. OL-338 ande Aeromonas sp. FA440. In: DOI. Y; FUKUDA. K. **Biodegradable Plastics and Polymers**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 410-416. DOI Y & FUKUDA K. p. 410-416, 1994.

KUBINYI, E. *et al.* Gut microbiome composition is associated with age and memory performance in pet dogs. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1-10, 2020.

KUMAR, S. *et al*. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35. p. 1547-1549, 2018.

LAGIER, J. C. *et al.* The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 237-264, 2015.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester, United Kingdom:

John Wiley and Sons. p. 115-175, 1991.

LAURENSON, M. K.; MLENGEYA, T.; SHIFERAW, F.; CLEAVELAND, S. Approaches to disease control in domestic canids for the conservation of endangered wild carnivores. **Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface implications for wildlife, livestock and human health**, p. 141-146, 2005.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996.

LEHTIMÄKI, J. *et al.* Simultaneous allergic traits in dogs and their owners are associated with living environment, lifestyle and microbial exposures. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-020-79055-x. Acesso em: 20 nov. 2020.

LEMOS, F. G. *et al.* Human threats to hoary and crab-eating foxes in central Brazil. **Canid News**, p. 1-6, 2011.

LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; PAULA, R. C.; DALPONTE, J. C. Lycalopex vetulus. **The IUCN Red List of Threatened Species 2020**. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T6926A87695615.en. Acesso em: 18 jan. 2021.

LEMOS, F. G.; FACURE, K. G. Seasonal variation in foraging group size of crab-eating foxes and hoary foxes in the Cerrado Biome, Central Brazil. **Mastozool. neotrop**., Mendoza, v. 18, n. 2, p. 239-245, 2011.

LI, G. *et al.* Emergence of Morganella morganii subsp. morganii in dairy calves, China. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p. 4-6, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0173-3. Acesso em: 05 out. 2020.

LICCIARDELLO, G.; CATARA, A. F.; CATARA, V. Production of polyhydroxyalkanoates and extracellular products using Pseudomonas corrugata and P. mediterranea: A review. **Bioengineering**, v. 6, n. 4, 2019.

LIMA, D. C. V. *et al.* Microbiologia de swabs retais e otológicos em carnívoros silvestres do zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 159-164, 2012.

LIU, M. H.; CHEN, Y. J.; LEE, C. Y. Characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis by Pseudomonas mosselii TO7 using crude glycerol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 3, p. 532-539, 2018. Disponível em: http://doi.org/10.1080/09168451.2017.1422386. Acesso em: 18 abr. 2020.

LÓPEZ, N. I. *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. **Advances in Applied Microbiology**, v. 93, p. 73-106, 2015.

LU, J.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226-248, 2009.

LUCHERINI, M. Cerdocyon thous. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4248A81266293.en. Acesso em: 18 jan. 2021.

LYU, T. *et al.* Changes in feeding habits promoted the differentiation of the composition and function of gut microbiotas between domestic dogs (Canis lupus familiaris) and gray wolves (Canis lupus). **AMB Express**, v. 8, n. 1. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13568-018-0652-x. Acesso em: 18 maio 2020.

MATOSAK, B.M.; FONSECA, L.M.G.; TAQUARY, E.C.; MARETTO, R.V.; BENDINI, H.D.N.; ADAMI, M. Mapping Deforestation in Cerrado Based on Hybrid Deep Learning Architecture and Medium Spatial Resolution Satellite Time Series. **Remote Sens.**, v. 14, n.1, p. 209, 2022.

MATOS, J. *et al.* First report of the emerging zoonotic agent Wohlfahrtiimonas chitiniclastica isolated from a retail frozen chicken in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 729-734, 2016.

MCDOUGALL, S. *et al.* Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 779-789, 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71562-X. Acesso em: 10 out. 2020.

MEGID, J. *et al.* First identification of canine distemper virus in hoary fox (Lycalopex vetulus): Pathologic aspects and virus phylogeny. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 303-305, 2010.

MENESES, L. *et al.* Pseudomonas chlororaphis as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. **New Biotechnology**, v. 55, n. Feb. 2019, p. 84-90, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.002. Acesso em: 19 abr. 2020.

MOLINA-MENOR, E. *et al.* High Culturable Bacterial Diversity From a European Desert: The Tabernas Desert. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-15, Jan. 2021.

MUHAMMADI *et al.* Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and

applications. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 8, n. 3-4, p. 56-77, 2015.

MULET, M. *et al.* An rpoD-based PCR procedure for the identification of Pseudomonas species and for their detection in environmental samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 3-4, p. 140-147, 2009.

MULET, M. *et al.* Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus Pseudomonas. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 455-464, 2012a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.08.007. Acesso em: 09 jan. 2021.

MULET, M. *et al.* Taxonomic characterisation of Pseudomonas strain L48 and formal proposal of Pseudomonas entomophila sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 145-149, 2012b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2011.12.003. Acesso em: 09 jan. 2021.

MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1513-1530, 2010.

NISHIMORI, E.; KITA-TSUKAMOTO, K.; WAKABAYASHI, H. Pseudomonas plecoglossicida sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, Plecoglossus altivelis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 83-89, 2000.

OREM, J. C. *et al.* Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming Bacillalles isolated from Brazilian soils. **International Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 511-520, 2019.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities. **Proceedings of the ASABE Annual International Meeting**, 2006.

PADILLA, D. *et al.* The pathogen Hafnia alvei in veterinary medicine: A review. **Journal of Applied Animal Research**, v. 43, n. 2, p. 231-235, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2014.963086. Acesso em: 21 abr. 2020.

PARK, S. Y. *et al.* Emergence of third-generation cephalosporin-resistant morganella morganii in a captive breeding dolphin in South Korea. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1-7, 2020.

PARTE, A. C. *et al*. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n.11, p. 5607-5612, 2020. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004332. Acesso em: 08 de abr. 2021.

PASCON, R. C. *et al.* Amylolytic microorganism from são paulo zoo composting: Isolation, identification, and amylase production. **Enzyme Research**, n. 1, 2011.

PAULA, R. C.; DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus*. (errata version published in 2016). **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en. Acesso em: 19 jan. 2021.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of Pseudomonas revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 106-116, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026. Acesso em: 28 maio 2020.

PEREIRA, A. C. *et al.* Crosstalk between culturomics and microbial profiling of egyptian mongoose (Herpestes ichneumon) gut microbiome. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, 2020.

PEREIRA, A. C.; CUNHA, M. V. An effective culturomics approach to study the gut microbiota of mammals. **Research in Microbiology**, v. 171, n. 8, p. 290-300, 2020.

PEREIRA, J. A. *et al.* INFECÇÃO URINÁRIA POR Morganella morganii EM CÃO JOVEM. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 3, p. 273-277, 2016.

PEREIRA, L. A. *et al.* Bioactivity under laboratory conditions of Brevibacillus laterosporus towards larvae and adults of Chrysomya putoria (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 158, p. 52-54, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.09.003. Acesso em: 21 mar. 2020.

PITHADIA, D. J. *et al.* Severe and Progressive Cellulitis Caused by Serratia marcescens Following a Dog Scratch. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 7, n. 235, 2019.

PlasticsEurope. **Plastics-The Facts**, 2019. Disponível em: https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf. Acesso em: 01 de set. 2021.

POBLETE-CASTRO, I.; WITTMANN, C.; NIKEL, P. I. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in Pseudomonas species. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 32-53, 2020.

PRASHANTHI, R. *et al.* Isolation, characterization, and molecular identification of soil bacteria showing antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Journal of**

Genetic Engineering and Biotechnology, v. 19, n. 1, 2021.

PRIETO, M. A. *et al*. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In: RAMOS, J. L.; FILLOUX, A. **Pseudomonas: a Model System in Biology,** Dordrecht: Springer, 2007. v. 5. p. 397-428.

PRIETO, A. *et al.* A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in Pseudomonas putida. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 341-357, 2016.

QI, J. *et al.* Identification of Wohlfahrtiimonas chitiniclastica isolated from an infected cow with hoof fetlow, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 174-176, 2016.

QUINN, P.J., *et al*. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAMOS, V. N. *et al.* Wild carnivores, domestic dogs and ticks: Shared parasitism in the Brazilian Cerrado. **Parasitology**, v. 147, n. 6, p. 689-698, 2020.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

RAZALI, K. *et al.* Oral flora of stray dogs and cats in Algeria: Pasteurella and other zoonotic bacteria. **Veterinary World**, v. 13, n. 12, p. 2806-2814, 2020.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from Pseudomonas putida KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 24044-24051, 1998.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Genetic diversity of thermoduric spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6927-6936, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13948. Acesso em: 15 jun. 2020.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, F. L. *et al.* Trypanosoma cruzi Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the T. cruzi Transmission Chain. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

RStudio: Integrated Development for R. Rstudio. RStudio Team / RStudio, PBC, 2020. Disponível em: http://www.rstudio.com/. Acesso em: 05 de abr. 2020.

RUDNIK, E. Biodegradability Testing of Compostable Polymer Materials, *In*: EBNESAJJAD, S. **Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics**. William Andrew Publishing, 2013. p. 213-263.

SACCO, L. P. *et al.* Properties of Polyhydroxyalkanoate Granules and Bioemulsifiers from Pseudomonas sp. and *Burkholderia* sp. Isolates Growing on Glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 990-1001, 2015.

SANO, S. N.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 1998.

SANZ-GARCÍA, F. *et al.* Coming from the wild: Multidrug resistant opportunistic pathogens presenting a primary, not human-linked, environmental habitat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, 2021.

SAPHIR, D. A.; CARTER, G. R. Gingival flora of the dog with special reference to bacterial associated with bites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 344-349, 1976.

SARATALE, R. G. *et al.* A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams. **Bioresource Technology**, v. 325, Jan. 2021.

SATHIYANARAYANAN, G. *et al*. Production and characterization of medium-chain length polyhydroxyalkanoates copolymer from Arctic psychrotrophic bacterium Pseudomonas sp. PAMC 28620. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 710-720, 2017.

SCARSELLA, E. *et al.* Blood microbiome: A new marker of gut microbial population in dogs? **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1-13, 2020a.

SCARSELLA, E. *et al.* Learning machine approach reveals microbial signatures of diet and sex in dog. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, p. 1-21. Aug. 2020b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0237874. Acesso em: 25 fev. 2020.

SCHOTT, D. *et al.* Detection of Rickettsia spp. and Bartonella spp. in Ctenocephalides felis fleas from free-ranging crab-eating foxes (Cerdocyon thous).

Medical and Veterinary Entomology, v. 33, n. 4, p. 536-540, 2019.

SHARMA, P. K. *et al.* Kinetics of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by a novel isolate of pseudomonas putida LS46. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 982-989, 2012.

SHARMA, P. K. *et al*. Genomics of PHA Synthesizing Bacteria. In: KOLLER, M. **The Handbook of Polyhydroxyalkanoates**: Microbial Biosynthesis and Feedstocks, Boca Raton: CRC Press, 2020. p. 52-87.

SHEN, M. *et al.* Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? **Environmental Pollution**, v. 263, 2020.

SIKES, R. S.; GANNON, W. L. Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the Use of Wild Mammals in Research. **Journal of Mammalogy**, v. 92, p. 235-253, 2011.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006. Acesso em: 21 jun. 2020.

SILVA, L. T. D.; SOUZA, A. C. F. F. D.; SILVA, L. A. M. D. Ecology, interactions and human perceptions of *Cerdocyon thous* in rural landscapes in the state of Pernambuco, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 3, p. 1-13, 2020.

SILVA, R. O. S. *et al. Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. **Anaerobe**, v. 28, p. 207-211, July 2014.

SILVA-QUEIROZ, S. R. *et al.* PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **Journal of Biotechnology**, v. 143, n. 2, p. 111-118, 2009.

SNAK, A. *et al.* Genome sequencing and analysis of plant growth-promoting attributes from leclercia adecarboxylata. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2021.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718-725, 2005.

SONG, S. J. *et al.* Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1-22, 2013.

SPERA, C. G. *et al.* First detection of canine parvovirus 2b DNA in a crab-eating fox pup (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

STEINBÜCHEL, A. *et al.* Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 103, n. 2-4, p. 217-230, 1992.

STIRLING, J. *et al.* Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 3, p. 166-172, 2008.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-16, 2009.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.

TAYEB, L. A. *et al.* Molecular phylogeny of the genus Pseudomonas based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 763-773, 2005.

THOMPSON, D. K.; SHARKADY, S. M. Expanding spectrum of opportunistic Cedecea infections: Current clinical status and multidrug resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 100, p. 461-469. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.036. Acesso em: 28 jun. 2020.

TOHYA, M. *et al.* Pseudomonas asiatica sp. nov., isolated from hospitalized patients in Japan and Myanmar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 1361-1368, 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap 9, p. 262.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 48, n. 3, p. 900-907, 2010.

VANAK, A. T.; GOMPPER, M. E. Dogs canis familiaris as carnivores: Their role and

function in intraguild competition. **Mammal Review**, v. 39, n. 4, p. 265-283, 2009.

VIEIRA, F. M. *et al.* Dipylidium caninum (Cyclophyllidea, Dipylidiidae) in a wild carnivore from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 1, p. 233-234, 2012.

VIEIRA-DA-MOTTA, O. *et al.* Microbiota and anthropic interference on antimicrobial resistance profile of bacteria isolated from Brazilian maned-wolf (Chrysocyon brachyurus). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1321-1326, 2013.

VOJTKOVÁ, H. *et al*. Characterization of Pseudomonas monteilii CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. **Folia Microbiol**, v. 60, n. 5, p. 411, 2015.

WANG, L. T. *et al*. Pseudomonas taiwanensis sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2094-2098, 2010.

WANG, X. *et al.* Canis lupus familiaris involved in the transmission of pathogenic Yersinia spp. in China. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 339-344, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.015. Acesso em: 14 set. 2019.

WEBER, M. N. *et al.* Virome of crab-eating (Cerdocyon thous) and pampas foxes (Lycalopex gymnocercus) from southern Brazil and Uruguay. **Infection, Genetics and Evolution journal**, v. 85. 2020.

WILD, M. *et al*. Selection and partial characterization of a Pseudomonas aeruginosa mono-rhamnolipid deficient mutant. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, p. 279-285, 1997.

YAMAMOTO, S. *et al.* Phylogeny of the genus Pseudomonas: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2385-2394, 2000.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of Pseudomonas putida strains deduced from the nucleotide sequences of gyrB, rpoD and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 813-819, 1998.

YOPASÁ-ARENAS, A.; FOSTIER, A. H. Exposure of Brazilian soil and groundwater to pollution by coccidiostats and antimicrobial agents used as growth promoters. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 112-121, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.338. Acesso em: 20 jan. 2020.

ZHANG, L. *et al*. Influence of dietary feathers on the fecal microbiota in captive Arctic fox: do dietary hair or feathers play a role in the evolution of carnivorous mammals. **Integrative Zoology**, v. 9, p. 583-589, 2014.

APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIAS

PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIAS

ANIMAL:	**IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL:**
AMOSTRA:	**IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:**
MEIO DE CULTURA:	**TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO:**
DATA:	

ID	PIGMENTO (+/-)	TAMANHO (G/M/P)*	FORMA/BORDA (CIRCULAR/IRREGULAR/PUNTIFORME/ONDULADA)	ELEVAÇÃO**	DENSIDADE*** (TRANSPARENTE/OPACA/TRANSLÚCIDA)	CONSISTÊNCIA (AMANTEIGADA/PEGAJOSA/MUCÓIDE/QUEBRADIÇA)	COR	APARÊNCIA DA SUPERFÍCIE (RUGOSA/GRANULAR/BRILHANTE/EMBAÇADA/CREMOSA)

* Grande: maior que 1mm de diâmetro; Média: 1mm de diâmetro; Pequena: menor que 1mm de diâmetro

**Achatada, umbilicada, convexa, centro elevado, elevada, domo

***Transparente (é possível ver através da colônia), opaca (não é possível ver através da colônia), translúcida (é possível ver através da colônia somente com luz sobre a colônia

Fonte: OPLUSTIL, CP, ZOCCOLI, CM, TOBOUTI, NR, SINTO, SI. Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica 3°Edição., São Paulo, 2010

APÊNDICE B - PREVALÊNCIA DOS FILOS BACTERIANOS POR TIPO DE AMOSTRA

Animal	Amostra	Filo	Prevalência (%)
Canis l. familiaris	oral	Proteobacteria	55
		Firmicutes	30
		Actinobacteria	14
		Bacteroidetes	1
Canis l. familiaris	retal	Firmicutes	52
		Proteobacteria	43
		Actinobacteria	5
Cerdocyon thous	oral	Proteobacteria	59
		Firmicutes	36
		Actinobacteria	5
		Bacteroidetes	1
Cerdocyon thous	retal	Proteobacteria	79
		Firmicutes	19
		Actinobacteria	2
Chrysocyon brachyurus	oral	Proteobacteria	80
		Firmicutes	20
Chrysocyon brachyurus	retal	Proteobacteria	75
		Firmicutes	25
Lycalopex vetulus	oral	Proteobacteria	63
		Firmicutes	33
		Actinobacteria	4
Lycalopex vetulus	retal	Proteobacteria	75
		Firmicutes	25

APÊNDICE C - PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS BACTERIANAS POR TIPO DE AMOSTRA

(continua)

Animal	Amostra	Família	Prevalência (%)
Canis l. familiaris	oral	Neisseriaceae	30
		Staphylococcaceae	15
		Micrococcaceae	12
		Morganellaceae	9
		Bacillaceae	6
		Lactobacillales	6
		Enterobacteriaceae	5
		Pseudomonadaceae	5
		Pasteurellaceae	3
		Enterococcaceae	3
		Microbacteriaceae	3
		Caulobacteraceae	1
		Lysobacteraceae	1
		Moraxellaceae	1
		Peptostreptococcaceae	1
		Weeksellaceae	1
Canis l. familiaris	retal	Enterococcaceae	29
		Enterobacteriaceae	27
		Morganellaceae	12
		Staphylococcaceae	11
		Lactobacillales	6
		Micrococcaceae	4
		Bacillaceae	3
		Caryophanaceae	2
		Paenibacillaceae	2
		Pseudomonadaceae	2
		Aeromonadaceae	1
		Nocardiaceae	1
		not assigned to family	1
		Pasteurellaceae	1
Cerdocyon thous	oral	Enterobacteriaceae	22
		Morganellaceae	13
		Lactobacillales	9
		Bacillaceae	8
		Staphylococcaceae	8
		Enterococcaceae	7
		Neisseriaceae	5
		Yersiniaceae	5
		Aeromonadaceae	4
		Micrococcaceae	3
		Moraxellaceae	3

PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS BACTERIANAS POR TIPO DE AMOSTRA
(continuação)

		Pseudomonadaceae	3
		Streptococcaceae	3
		Erwiniaceae	1
		Paenibacillaceae	1
		Aerococcaceae	1
		Dermabacteraceae	1
		Flavobacteriaceae	1
		Gordoniaceae	1
		Hafniaceae	1
Cerdocyon thous	retal	Enterobacteriaceae	37
		Morganellaceae	33
		Enterococcaceae	14
		Pseudomonadaceae	8
		Bacillaceae	2
		Streptococcaceae	2
		Micrococcaceae	2
		Hafniaceae	1
		Neisseriaceae	1
		Staphylococcaceae	1
Chrysocyon brachyurus	oral	Neisseriaceae	27
		Morganellaceae	20
		Bacillaceae	7
		Enterobacteriaceae	7
		Moraxellaceae	7
		not assigned to family	7
		Paenibacillaceae	7
		Pseudomonadaceae	7
		Staphylococcaceae	7
		Yersiniaceae	7
Chrysocyon brachyurus	retal	Enterobacteriaceae	31
		Morganellaceae	31
		Pseudomonadaceae	13
		Bacillaceae	6
		Enterococcaceae	6
		Lactobacillales	6
		Staphylococcaceae	6
Lycalopex vetulus	oral	Enterobacteriaceae	26
		Morganellaceae	13
		Enterococcaceae	11
		Pseudomonadaceae	6
		Lactobacillales	5
		Streptococcaceae	5
		Yersiniaceae	5
		Bacillaceae	4

PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS BACTERIANAS POR TIPO DE AMOSTRA
(conclusão)

		Micrococcaceae	4
		Moraxellaceae	4
		Staphylococcaceae	4
		Neisseriaceae	3
		Pasteurellaceae	3
		Erwiniaceae	2
		Paenibacillaceae	2
		Peptostreptococcaceae	1
Lycalopex vetulus	retal	Morganellaceae	43
		Enterobacteriaceae	25
		Enterococcaceae	22
		Pseudomonadaceae	6
		Bacillaceae	2
		Neisseriaceae	2
		Staphylococcaceae	2

APÊNDICE D - MATRIZ DE DISTÂNCIA DO GENE 16S rRNA PARA O ISOLADO MA09B

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	**MA09B**																				
2	*P. aestus* CMAA 1-215	0,0142																			
3	*P. alloputida* Kh7	0,0016	0,0118																		
4	*P. asiatica* RYU5	0,0008	0,0134	0,0023																	
5	*P. entomophila* L48	0,0008	0,0134	0,0024	0,0016																
6	*P. fulva* NBRC 16637	0,0110	0,0190	0,0094	0,0102	0,0118															
7	*P. guariconensis* PCAVU11	0,0087	0,0198	0,0102	0,0079	0,0079	0,0182														
8	*P. hunanensis* LV	0,0031	0,0118	0,0016	0,0031	0,0047	0,0102	0,0110													
9	*P. juntendi* BML3	0,0031	0,0126	0,0016	0,0023	0,0039	0,0078	0,0102	0,0023												
10	*P. monteilii* NBRC 103158	0,0008	0,0150	0,0023	0,0016	0,0016	0,0118	0,0094	0,0047	0,0039											
11	*P. mosselii* CIP 105259	0,0031	0,0142	0,0047	0,0023	0,0024	0,0126	0,0086	0,0055	0,0047	0,0039										
12	*P. parafulva* NBRC 16636	0,0094	0,0190	0,0079	0,0086	0,0103	0,0016	0,0166	0,0086	0,0063	0,0102	0,0110									
13	*P. piscis* MC042	0,0142	0,0000	0,0118	0,0134	0,0134	0,0190	0,0198	0,0118	0,0126	0,0150	0,0142	0,0190								
14	*P. plecoglossicida* NBRC 103162	0,0008	0,0134	0,0016	0,0016	0,0016	0,0118	0,0094	0,0031	0,0039	0,0016	0,0039	0,0102	0,0134							
15	*P. putida* ATCC 12633	0,0110	0,0158	0,0086	0,0102	0,0119	0,0134	0,0182	0,0086	0,0094	0,0110	0,0126	0,0142	0,0158	0,0102						
16	*P. reidholzensis* CCOS 865	0,0126	0,0190	0,0110	0,0118	0,0135	0,0150	0,0198	0,0118	0,0110	0,0134	0,0142	0,0158	0,0190	0,0134	0,0110					
17	*P. sichuanensis* WCHPs060039	0,0055	0,0134	0,0071	0,0047	0,0047	0,0126	0,0110	0,0079	0,0071	0,0063	0,0055	0,0134	0,0134	0,0063	0,0071	0,0086				
18	*P. soli* F-279	0,0086	0,0182	0,0094	0,0078	0,0079	0,0102	0,0142	0,0094	0,0102	0,0094	0,0055	0,0086	0,0182	0,0078	0,0166	0,0190	0,0110			
19	*P. taiwanensis* BCRC 17751	0,0008	0,0134	0,0023	0,0000	0,0016	0,0102	0,0079	0,0031	0,0023	0,0016	0,0023	0,0086	0,0134	0,0016	0,0102	0,0118	0,0047	0,0078		
20	*S. aureus ATCC* 12600	0,2571	0,2497	0,2537	0,2557	0,2590	0,2520	0,2556	0,2545	0,2544	0,2579	0,2590	0,2521	0,2497	0,2568	0,2548	0,2522	0,2581	0,2578	0,2557	

APÊNDICE E - MATRIZ DE DISTÂNCIA DO GENE 16S rRNA PARA O ISOLADO 416O

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	**MA416O**															
2	*P. alloputida* Kh7	0,0039														
3	*P. asiatica* RYU5	0,0016	0,0024													
4	*P. entomophila* L48	0,0016	0,0024	0,0016												
5	*P. guariconensis* PCAVU11	0,0079	0,0103	0,0079	0,0079											
6	*P. hunanensis* LV	0,0039	0,0008	0,0023	0,0039	0,0103										
7	*P. juntendi* BML3	0,0039	0,0016	0,0023	0,0039	0,0102	0,0016									
8	*P. monteilii* NBRC 103158	0,0031	0,0024	0,0016	0,0016	0,0095	0,0039	0,0039								
9	*P. mosselii* CIP 105259	0,0023	0,0047	0,0023	0,0024	0,0087	0,0047	0,0047	0,0039							
10	*P. plecoglossicida* NBRC 103162	0,0031	0,0016	0,0016	0,0016	0,0095	0,0023	0,0039	0,0016	0,0039						
11	*P. putida* ATCC 12633	0,0118	0,0087	0,0102	0,0119	0,0182	0,0079	0,0094	0,0110	0,0126	0,0102					
12	*P. sichuanensis* WCHPs060039	0,0047	0,0071	0,0047	0,0047	0,0110	0,0071	0,0071	0,0063	0,0055	0,0063	0,0071				
13	*P. soli* F-279	0,0079	0,0094	0,0079	0,0079	0,0142	0,0086	0,0102	0,0094	0,0055	0,0079	0,0166	0,0110			
14	*P. taiwanensis* BCRC 17751	0,0016	0,0024	0,0000	0,0016	0,0079	0,0023	0,0023	0,0016	0,0023	0,0016	0,0102	0,0047	0,0079		
15	*S. aureus* ATCC 12600	0,2586	0,2541	0,2561	0,2594	0,2560	0,2538	0,2549	0,2584	0,2595	0,2573	0,2553	0,2585	0,2583	0,2561	

APÊNDICE F - MATRIZ DE DISTÂNCIA DOS GENES HOUSEKEEPING E MLSA DO ISOLADO MA09B

	1	2	3	4	5	6	7
1 **MA09B 16rRNA**							
2 *P. asiatica*	0,0008						
3 *P. entomophila*	0,0008	0,0015					
4 *P. monteilii*	0,0008	0,0015	0,0015				
5 *P. taiwanensis*	0,0008	0,0015	0,0015	0,0015			
6 *P. plecoglossicida*	0,0008	0,0000	0,0015	0,0015	0,0015		
7 *M. morganii*	0,1454	0,1446	0,1451	0,1455	0,1462	0,1446	

	1	2	3	4	5	6	7
1 **MA09B rpoB**							
2 *P. asiatica*	0,0103						
3 *P. entomophila*	0,0539	0,0608					
4 *P. monteilii*	0,0275	0,0321	0,0677				
5 *P. taiwanensis*	0,0448	0,0517	0,0563	0,0528			
6 *P. plecoglossicida*	0,0275	0,0367	0,0677	0,0390	0,0574		
7 *M. morganii*	0,2678	0,2701	0,2759	0,2736	0,2693	0,2678	

	1	2	3	4	5	6	7
1 **MAO9B rpoD**							
2 *P. asiatica*	0,0350						
3 *P. entomophila*	0,1345	0,1331					
4 *P. monteilii*	0,0574	0,0742	0,1443				
5 *P. taiwanensis*	0,1092	0,1120	0,1022	0,1022			
6 *P. plecoglossicida*	0,1310	0,1338	0,1437	0,1352	0,1042		
7 *M. morganii*	0,4513	0,4556	0,4584	0,4499	0,4669	0,4496	

	1	2	3	4	5	6	7
1 **MA09B gyrB**							
2 *P. asiatica*	0,0457						
3 *P. entomophila*	0,0808	0,0783					
4 *P. monteilii*	0,0613	0,0601	0,0887				
5 *P. taiwanensis*	0,0926	0,0875	0,0808	0,0887			
6 *P. plecoglossicida*	0,1108	0,1175	0,1095	0,1147	0,1160		
7 *M. morganii*	0,3220	0,3198	0,3220	0,3298	0,3128	0,3272	

	1	2	3	4	5	6	7
1 **MA09B MLSA**							
2 *P. asiatica*	0,0186						
3 *P. entomophila*	0,0564	0,0570					
4 *P. monteilii*	0,0309	0,0348	0,0636				
5 *P. taiwanensis*	0,0476	0,0490	0,0537	0,0484			
6 *P. plecoglossicida*	0,0597	0,0625	0,0650	0,0636	0,0589		
7 *M. morganii*	0,2712	0,2716	0,2745	0,2740	0,2726	0,2719	

APÊNDICE G - MATRIZ DE DISTÂNCIA DOS GENES HOUSEKEEPING E MLSA DO ISOLADO 416O

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 **416O 16S rRNA**								
2 *P. asiatica*	0,0016							
3 *P. entomophila*	0,0016	0,0016						
4 *P. monteilii*	0,0031	0,0016	0,0016					
5 *P. mosselii*	0,0023	0,0023	0,0024	0,0039				
6 *P. plecoglossicida*	0,0031	0,0016	0,0016	0,0016	0,0039			
7 *P. taiwanensis*	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0023	0,0016		
8 *M. morganii*	0,1526	0,1525	0,1529	0,1534	0,1501	0,1540	0,1525	

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 **416O rpoB**								
2 *P. asiatica*	0,0433							
3 *P. entomophila*	0,0622	0,0611						
4 *P. monteilii*	0,0522	0,0311	0,0678					
5 *P. mosselii*	0,0511	0,0344	0,0567	0,0411				
6 *P. plecoglossicida*	0,0411	0,0356	0,0678	0,0378	0,0422			
7 *P. taiwanensis*	0,0578	0,0512	0,0567	0,0523	0,0556	0,0567		
8 *M. morganii*	0,2692	0,2714	0,2725	0,2736	0,2692	0,2681	0,2695	

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 **416O rpoD**								
2 *P. asiatica*	0,1372							
3 *P. entomophila*	0,1136	0,1342						
4 *P. monteilii*	0,1313	0,0782	0,1460					
5 *P. mosselii*	0,0767	0,1283	0,0885	0,1327				
6 *P. plecoglossicida*	0,1224	0,1121	0,1047	0,1018	0,1224			
7 *P. taiwanensis*	0,1106	0,1342	0,1490	0,1357	0,1239	0,1047		
8 *M. morganii*	0,4473	0,4695	0,4651	0,4636	0,4502	0,4740	0,4487	

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 **416O gyrB**								
2 *P. asiatica*	0,0969							
3 *P. entomophila*	0,0805	0,0830						
4 *P. monteilii*	0,1006	0,0604	0,0918					
5 *P. mosselii*	0,0704	0,0780	0,0541	0,0855				
6 *P. plecoglossicida*	0,0792	0,0893	0,0843	0,0918	0,0843			
7 *P. taiwanensis*	0,1119	0,1157	0,1132	0,1157	0,1107	0,1208		
8 *M. morganii*	0,3278	0,3139	0,3228	0,3291	0,3177	0,3127	0,3266	

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 **416O MLSA**								
2 *P. asiatica*	0,0578							
3 *P. entomophila*	0,0546	0,0586						
4 *P. monteilii*	0,0603	0,0359	0,0644					
5 *P. mosselii*	0,0430	0,0501	0,0430	0,0548				
6 *P. plecoglossicida*	0,0512	0,0495	0,0551	0,0487	0,0528			
7 *P. taiwanensis*	0,0597	0,0627	0,0669	0,0638	0,0616	0,0602		
8 *M. morganii*	0,2739	0,2755	0,2772	0,2786	0,2714	0,2757	0,2739	