

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOINFORMÁTICA

RAQUEL RIYUZO DE ALMEIDA FRANCO

Diversidade taxonômica e funcional da microbiota de fezes de macacos bugios (*Alouatta spp.*) de cativeiro e vida livre

São Paulo, SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOINFORMÁTICA

RAQUEL RIYUZO DE ALMEIDA FRANCO

Diversidade taxonômica e funcional da microbiota de fezes de macacos bugios (*Alouatta spp.*) de cativeiro e vida livre

Tese apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências (Área de concentração: Bioinformática)

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ALINE MARIA DA SILVA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS SETUBAL

São Paulo, SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

RAQUEL RIYUZO DE ALMEIDA FRANCO

Diversidade taxonômica e funcional da microbiota de fezes de macacos bugios (*Alouatta* spp.) de cativeiro e vida livre

Tese apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências (Área de concentração: Bioinformática)

Profa. Dra. Aline Maria da Silva
(Orientadora e Presidente)

APROVADA POR:

Carla Taddei de Castro Neves

Ronaldo Fumio Hashimoto

Vivian Helena Pellizaro

São Paulo, SP

Data da defesa: 16 de dezembro de 2022

“Não podemos esperar construir o mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar para o nosso próprio aprimoramento.”

Marie Curie

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Aline Maria da Silva, pela paciência e principalmente por ter sido essencial no meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

Ao meu coorientador Prof. Dr. João Carlos Setubal, pela paciência e por todo apoio a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio Cezar Franco de Oliveira, pelo apoio e por acreditar nesse projeto.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) por possibilitar a realização de projeto. À toda equipe do parque e, em especial, Dr. Paulo Magalhães Bressan, Dr. João Batista da Cruz e Dra. Patricia Ramos.

A Dra. Layla Farage Martins, especialista de laboratório do CATG do IQUSP, por todo o apoio na realização dos sequenciamentos.

A Ana Butarelli e Lucas Salomão, pelo companheirismo e por toda ajuda prestada a este trabalho.

Ao Dr. Andrew Thomaz, pela amizade e ensinamentos no início dessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório da Aline-Lab e Setulab, que sempre estiveram comigo em todas as etapas do trabalho, em especial a Livia, Melline, Ana Carolina, Jhonatas, Suzana, Guillermo, Fernando, Carlos e Deyvid.

Ao time de Futsal Feminino do IME-USP, pelas conquistas, parceria e por me acolherem nesses anos de doutorado.

A todos da equipe Varsomics, pelas risadas proporcionadas desde o início das manhãs e por me apoiarem no finalzinho deste doutorado.

Aos meus familiares que tiveram que suportar minha ausência e que continuaram me acompanhando e apoiando mesmo distantes.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho.

Aos macaquinhos do Zoológico: Buba, Babi, Edson, Pandora e Pedrinho, sem eles esse trabalho não existiria.

E por fim, a Eimy Honda, e a tudo que ela representa em minha vida. Obrigada por sempre estar ao meu lado, mesmo nos momentos de crises, estresse e ansiedade.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da FAPESP (Projeto Temático 2011/50870-6) e da CAPES (Projeto Biocomp 3385/2013). Raquel Riyuzo de Almeida Franco recebeu bolsa de Doutorado da CAPES vinculada ao Projeto Biocomp 3385/2013.

Resumo

FRANCO, A. R. R. Diversidade taxonômica e funcional da microbiota de fezes de macacos bugios (*Alouatta* spp.) de cativeiro e vida livre. 2022. 107 p. Tese (Doutorado em Bioinformática) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022

O microbioma intestinal é um ambiente complexo e desempenha um papel fundamental na fisiologia e no metabolismo do hospedeiro. O microbioma intestinal de macacos bugios da espécie *Alouatta pigra* tem sido investigado, mas pouco se sabe sobre o microbioma de bugios das espécies *Alouatta caraya* (bugio-preto-e-ruivo) e *Alouatta guariba clamitans* (bugio-ruivo). Nesta tese de doutorado investigamos o microbioma fecal de macacos bugios, de cativeiro e vida livre, da espécie *A. caraya* e *A. guariba clamitans* utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo. A partir do material fecal foi estabelecida e caracterizada uma coleção de isolados cultiváveis, dos quais dois foram selecionados para sequenciamento genômico completo. A análise genômica aponta o isolado HMB01 como forte candidato a nova espécie do gênero *Pseudochrobactrum* enquanto o isolado HMB02 corresponde à espécie *Limosilactobacillus gorillae* e possui características genômicas essenciais para um organismo probiótico. A composição bacteriana da microbiota fecal foi acessada do sequenciamento de *amplicons* (região V3-V4) do gene do rRNA 16S e de metagenômica *shotgun* de 25 amostras de fezes de indivíduos de cativeiro e de vida livre coletadas em diferentes épocas entre 2013 e 2016. As análises indicaram uma clara separação entre amostras de bugios de cativeiro e bugios de vida livre, em termos de composição microbiana e categorias funcionais COG. O grupo de vida livre apresentou a diversidade alfa (FaithPD) relativamente maior quando comparamos com indivíduos de cativeiro. Em ambos os grupos, os filos mais abundantes foram Bacteroidetes e Firmicutes. Em indivíduos de vida livre foi observado maior abundância relativa e prevalência de táxons relacionados a saúde do hospedeiro como as famílias *Prevotellaceae* e *Ruminococcae*; os gêneros *Prevotella* e *Ruminococcus* e a espécie *Faecalibacterium prausnitzii*. No grupo cativo os táxons *Succinivibrio*, *Treponema 2* e *Prevotella 9* apresentaram maior abundância relativa ($p < 0,05$). Recuperamos 58 genomas a partir de dados de metagenômica MAGs, destes, 26 apontam para potenciais novas espécies bacterianas, a maioria deles ($n=21$) recuperados de bugios de vida livre, revelando novidades taxonômicas e genomas específicos do hospedeiro, enquanto os MAGs de bugios de cativeiro foram taxonomicamente classificados em grupos mais conhecidos. Não encontramos diferença significativa na degradação de biomassa e a produção de SCAFs

entre os dois grupos, mas a presença de enzimas degradadoras de biomassa e enzimas relacionadas a produção de acetato e butirato nos MAGs, indicam a presença de uma comunidade bacteriana enriquecida em produtoras de SCAFs. A busca por genes de resistência a antibióticos (ARGs) indicou que a microbiota de bugios de cativeiro carrega mais genes de resistência a antibióticos quando comparado a bugios de vida livre. Por fim, neste trabalho mostramos que a compreensão completa do microbioma intestinal de animais de cativeiro e vida livre pode nos fornecer novas informações para identificação de novas espécies e o entendimento do papel funcional que esta microbiota desempenha na saúde do hospedeiro pode auxiliar numa reintrodução bem-sucedida de animais de cativeiro em seu *habitat* natural.

Palavras chaves: Bugio, *Allouata* spp., microbioma, metagenoma, MAGs, *Lactobacillus gorillae*, *Pseudochrobactrum* spp.

Abstract

FRANCO, A. R. R. Taxonomic and functional diversity in the fecal microbiome of howler monkeys (*Alouatta* spp.) in captive and non-captive. 2022. 107p. Tese (Doutorado em Bioinformática) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

The gut microbiome is a complex environment and plays a key role in host physiology and metabolism. The gut microbiome of *Alouatta pigra* monkeys has been investigated, but little is known about the microbiome of *Alouatta caraya* (black-and-red howler monkeys) and *Alouatta guariba clamitans* (red howler monkeys). In this doctoral thesis we investigate the fecal microbiome of captive and non-captive *A. caraya* and *A. guariba clamitans* monkeys using culture-dependent and culture-independent approaches. From the fecal material a collection of culturable isolates was established and characterized, of which two were selected for whole genome sequencing. Genomic analysis points isolate HMB01 as a strong candidate for a new species of the genus *Pseudochrobactrum* while isolate HMB02 corresponds to the species *Limosilactobacillus gorillae* and possesses genomic features essential for a probiotic organism. The bacterial composition of the fecal microbiota was accessed from amplicon sequencing (V3-V4 region) of the 16S rRNA gene and shotgun metagenomics of 25 fecal samples from captive and free-living individuals collected at different times between 2013 and 2016. The analyses indicated a clear separation between samples from captive and non-captive howler monkeys in terms of microbial composition and COG functional categories. The non-captive group showed relatively higher alpha diversity (FaithPD) when compared to captive individuals. In both groups, the most abundant phyla were Bacteroidetes and Firmicutes. In non-captive individuals we observed higher relative abundance and prevalence of taxa related to host health such as the families Prevotellaceae and Ruminococcaceae; the genera *Prevotella* and *Ruminococcus* and the species *Faecalibacterium prausnitzii*. In the captive group the taxa *Succinivibrio*, *Treponema* 2 and *Prevotella* 9 showed the highest relative abundance ($p < 0.05$). We recovered 58 genomes from metagenomics MAGs data, of these, 26 point to potential new bacterial species, most of them ($n=21$) recovered from non-captive howler monkeys, revealing taxonomic novelties and host-specific genomes, We found no significant difference in biomass degradation and the production of SCAFs between the two groups, but the presence of biomass-degrading enzymes and enzymes related to acetate and butyrate production in the MAGs indicates the presence of a bacterial community enriched in SCAFs producers. The search for antibiotic resistance genes (ARGs) indicated that the microbiota of captive howler monkeys

carries more antibiotic resistance genes when compared to non-captive howler monkeys. Finally, in this work we show that a complete understanding of the gut microbiome of captive and non-captive animals can provide us with new information for identification of new species and understanding the functional role this microbiota plays in host health can aid in the successful reintroduction of captive animals into their natural habitat.

Key words: Howler monkeys, *Allouata* spp., microbiome, metagenome, MAGs, *Lactobacillus gorillae*, *Pseudochrobactrum* spp.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ANI: *Average Nucleotide Identity*
- ANOSIM: *Analysis of similarities*
- ARG: *Antimicrobial Resistance Gene*
- ASV: *Amplicon sequence Sequence Variant*
- BIBMB: Banco de Isolados Bacterianos de Macacos Bugio
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- C: Animal Cativo (cativeiro)
- CARD: *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*
- CATG: Centro Avançado de Tecnologias em Genômica, IQ-USP
- CAZyme: *Carbohydrate-Active Enzymes*
- cDNA: DNA complementar
- CDS: sequência codificadora
- COG: *Clusters of Orthologous Groups of proteins*
- dDDH: hibridização digital DNA-DNA
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNase: desoxirribonuclease
- FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo
- GBDP: *Genome BLAST Distance Phylogeny*
- GGDC: *Genome-To-Genome Distance Calculator*
- GH: Glicosil hidrolase
- HTS: *High-Throughput Sequencing*
- IMG/M: *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes System*
- KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- MAG: *Metagenome Assembled Genome*
- MALDI-TOF-MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry*
- NC: Animal não cativo (vida livre)
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
- nt: nucleotídeo
- OTU: *Operational Taxonomic Unit*
- pb: par de bases
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- PD: Índice de Diversidade Filogenética
- PE: *paired end*

PERMANOVA: Análise de variância permutacional multivariada

Q30: *Quality score of 30* (Parâmetro de qualidade do sequenciamento)

QIIME2- *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*

RDP: *Ribosomal Database Project*

RGI: *Resistance Gene Identifier*

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossômico

rRNA16S: rRNA da subunidade 16S (subunidade menor do ribossomo)

SCFAs: *Short-Chain Fatty Acids*

tRNA: RNA transportador

USEARCH: *Ultra-fast Sequence Analysis*

V3: Região hipervariável 3 do rRNA 16S

V4: Região hipervariável 4 do rRNA 16S

Lista de Figuras

- Figura 1: Resultado da amplificação por PCR e inferência taxonômica do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S.** **A:** Avaliação do produto de PCR purificado de parte dos isolados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5mg/μl). O marcador de tamanho está indicado pela letra P e o controle negativo por C-. A seta aponta o *amplicon* de ~580 bp. **B:** Atribuição taxonômica realizada com o classificador RDP *classifier* para 58 sequências de boa qualidade, com o corte de confiança de 0.8. As barras indicam a contagem de bactérias isoladas de fezes de bugios de cativeiro (azul) e de vida livre (verde). 38
- Figura 2: Isolados identificados a nível de espécie.** As espécies bacterianas cultivadas a partir de fezes de animais de cativeiro (azul) e vida livre (verde) estão indicadas no diagrama..... 39
- Figura 3: Banco de dados de isolados de material fecal de bugios.** Ilustração do banco de dados de isolados bacterianos de fezes de macacos bugios, disponível em: <http://lbi.usp.br/metazoo/>..... 40
- Figura 4: Representação dos módulos metabólicos completos encontrados no genoma do isolado HMB01.** **A:** Distribuição de Módulos de vias KEGG (Unidades funcionais de conjuntos de genes em vias metabólicas). **B:** Classificação funcional dos genes COG, as categorias COG são as seguintes: tradução e biogênese (J); processamento e modificação de RNA (A); produção e conversão de energia (C); divisão celular, partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); e mecanismos de defesa (V). 43
- Figura 5: Análise filogenética do isolado HMB01.** Análise filogenética utilizando a ferramenta TYGS com banco de dados TYGS-BD para o gene rRNA16S completo (A) e pelo método GBDP (B). 44

- Figura 6: Métricas de qualidade para os genomas de referência de *Pseudochrobactrum* spp..** Visualização dos 14 genomas completos do gênero *Pseudochrobactrum* disponíveis no GenBank (acesso em 06/2022), a seta vermelha indica o genoma que foi excluído das análises seguintes. 45
- Figura 7: Core genoma.** A: Análise filogenética baseada no *core* genoma comparando a cepa HMB01 com as 11 referências do GenBank mais próximas. B: O *core* genoma está sinalizado em verde, indicando a região compartilhada entre os 4 genomas. Em azul, destacamos a região *singleton* da cepa HMB01, indicando as regiões únicas do isolado HMB01..... 47
- Figura 8: Análise comparativa das proteínas ortólogas entre o isolado HMB01, GCF_008801715.1, GCF_008801715.1 e GCF_019464455 (Wa41.01b-1).** A: Diagrama de OrthoVenn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas únicas e compartilhados de cada genoma. B: Contagens de *clusters* e proteínas em diferentes seções do diagrama de Venn, à esquerda os quadros verdes indicam a presença dos clusters e os cinzas indicam ausência, à direita a contagem de clusters compartilhados e a contagem de proteínas referente a cada genoma..... 48
- Figura 9: Representação dos módulos metabólicos completos encontrados no genoma do isolado HMB02.** A: Distribuição de Módulos de vias KEGG (Unidades funcionais de conjuntos de genes em vias metabólicas. B: Classificação funcional dos genes COG, as categorias COG são as seguintes: tradução e biogênese (J); processamento e modificação de RNA (A); produção e conversão de energia (C); divisão celular, partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); e mecanismos de defesa (V). 51
- Figura 10: Análise comparativa das proteínas ortólogas entre o isolado HMB02 e KZ01.** Diagrama de OrthoVenn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas únicas e compartilhados pelos dois genomas..... 52

- Figura 11: Diversidade alfa e beta para amostras de bugios de cativo e vida livre.** (A): Curvas de rarefação indicando o número de ASVs por amostra. Linhas tracejadas e pontilhadas representam amostras de indivíduos de cativo e vida livre, respectivamente. As linhas cheias indicam a média de ASVs observadas para ambos os grupos. Azul: amostras de indivíduos de cativo; verde: amostras de indivíduos de vida livre. (B): Boxplots mostrando a diversidade alfa em amostras de bugios de cativo e vida livre usando diferentes métricas (ASVs observados e Distância Filogenética (PD)). (C): Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), utilizando a métrica Bray-Curtis, geradas a partir da abundância de ASVs classificadas em diferentes níveis (Filo, Família e Gênero). Pontos em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre. As elipses representam o nível de confiança de 95%, assumindo uma distribuição multivariada. 63
- Figura 12: Perfil da comunidade bacteriana.** Abundância relativa de ASVs, classificadas a nível de Filo (A), Família (B) e Gênero (C), em B e C somente táxons com abundância >1% em pelo menos um grupo (cativo e não cativo) foram considerados. Análise de abundância diferencial a nível de filo (D), família (E) e gênero (F), utilizando o *software* STAMP para o teste estatístico Welch's t-test, com correção Storey-FDR. 66
- Figura 13: Diagrama de Venn do *core-microbiome*.** (A) CORE utilizando 100%, (B) CORE utilizando 90%, em azul estão representadas ASVs de bugios de cativo e em verde de vida livre. 67
- Figura 14: Abundância relativa das ASVs do *core-microbiome*.** Box-plot representando as abundâncias relativas das ASVs classificadas como *core* do grupo cativo (azul) e não-cativo (verde). As linhas tracejadas representam o CORE 90% e linhas cheias representam CORE 100%. 68
- Figura 15: Classificação taxonômica dos *reads* de *shotgun* com software Kraken2.** Estão listadas as 25 espécies mais abundantes identificadas em (A) bugios de cativo e (B) bugios de vida livre, o número representa a quantidade de *reads* classificadas em cada táxon. No eixo x estão representadas 5 categorias taxonômicas: D: Domínio, P: Filo, F: Família, G: Gênero e S: Espécie. 70
- Figura 16: Árvore filogenética dos 58 MAGs recuperados.** Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de 120 genes marcadores bacterianos (Parks *et al.*,

2015) (Parks et al., 2018) usados para inferência filogenética. As barras na horizontal representam a abundância em RPM de cada MAG em amostras de cativo (azul) e vida livre (verde). Os *heatmaps*, amarelo e roxo, representam a porcentagem de contaminação e completude de cada MAG, respectivamente. . 77

Figura 17: Perfil funcional baseada na anotação COG. **A:** Análise de Componentes Principais (PCA) geradas a partir da anotação de COGs baseada nos *contigs* após normalização. Pontos em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre; os círculos representam amostras coletadas no outono/inverno e o quadrado na primavera/verão. As elipses representam o nível de confiança de 95%, assumindo uma distribuição multivariada. **B:** Contagem de Classificação funcional dos genes COG, são mostradas apenas as contagens de genes que tiveram significância estatística ($p < 0,05$). As categorias COG são as seguintes: processamento e modificação de RNA (A); dinâmica e estrutura de cromatina (B); produção e conversão de energia (C); partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); divisão celular, transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); tradução e biogênese (J); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); mecanismos de defesa (V); genes envolvidos na categoria de fagos, profagos, elementos de transposição e plasmídeos (X); estrutura extracelular; (W); estrutura nuclear (Y); citoesqueleto (Z). Barras em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre..... 78

Figura 18: Perfil de CAZymes dos 58 MAGs. Distribuição das famílias CAZy relacionadas a degradação de celulose (A), Amilase (B) e Pectinase (C). No eixo X estão os 58 MAGs agrupados por condição: cativo (azul) e vida livre (verde) e sub-grupados por família. O eixo Y apresenta a contagem de cada família CAZy de interesse. 80

Figura 19: Análise comparativa das enzimas relacionadas a produção de acetato e butirato dos 58 MAGs. No eixo y estão as identificações dos MAGs e no eixo x

as enzimas analisadas. A linha na lateral esquerda indica a origem dos MAGs, em azul (BIN_01 a BIN_22) MAGs de bugios de cativeiro e em verde (BIN_23 a BIN_58) MAGs de bugios de vida livre..... 81

Figura 20: Comparação dos 58 MAGs com bancos públicos. A: Distribuição geográfica das referências dos 13 MAGs que tiveram correspondência no banco do UHGG. B: Ambiente onde foram coletadas as amostras das referências do banco de dados GEM dos 7 MAGs correspondentes..... 88

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Informações dos genomas referência extraídos do NCBI para análises comparativas | 36 |
| Tabela 2: Classificação taxonômica (MALDI-TOF-MS) dos 41 isolados microaerofílicos da coleta de outono/inverno..... | 37 |
| Tabela 3: Classificação taxonômica através do sequenciamento parcial do gene rRNA16S das 24 sequências com baixa qualidade..... | 38 |
| Tabela 4: Distribuição geral dos 441 isolados bacterianos da coleção | 39 |
| Tabela 5: Métricas da montagem do genoma da cepa HMB01 com quatro montadores (A5, Discover, Mira e Spades) e após refinamento com o <i>software</i> Metassembler. .. | 41 |
| Tabela 6: Métricas do genoma do isolado HMB01. | 42 |
| Tabela 7: Valores de ANI e dDDH do isolado HMB01 com os 13 genomas de <i>Pseudochrobactrum</i> disponíveis do GenBank..... | 46 |
| Tabela 8: Módulos completos de metabólicas do isolado HMB01 | 48 |
| Tabela 9: Métricas da montagem do genoma da cepa HMB02 com quatro montadores (A5, Discover, Mira e Spades) e após refinamento com o <i>software</i> Metassembler ... | 49 |
| Tabela 10: Métricas do genoma do isolado HMB02 | 50 |
| Tabela 11: Resultado do sequenciamento das bibliotecas de <i>amplicon</i> da região V3-V4 gene do rRNA 16S das 25 amostras fecais de bugios de cativeiro (C) e vida livre (NC).60 | |
| Tabela 12: Resultado do sequenciamento das bibliotecas <i>shotgun</i> das 19 amostras fecais de bugios de cativeiro (C) e vida livre (NC). | 61 |
| Tabela 13: Número total de ASVs por amostra..... | 62 |
| Tabela 14: Beta diversidade. Testes PERMANOVA e ANOSIM (999 permutações) para métricas de diversidade beta em relação ao hábitat, sexo e espécie..... | 64 |
| Tabela 15: Classificação taxonômica de sequências provenientes de organismos eucariotos. Estão listados os 12 gêneros identificados pelo <i>software</i> CCMetagen. RPM: <i>Reads per million</i> | 69 |
| Tabela 16: Métricas dos 58 MAGs recuperados | 72 |
| Tabela 17: Classificação taxonômica dos 58 MAGs. | 74 |
| Tabela 18: Genes de resistência encontrados em 5 MAGs de bugios de cativeiro e vida livre. | 82 |
| Tabela 19 Lista dos 7 MAGs que tiveram correspondência no catálogo de MAGs de animais vertebrados de Nicholas D. Youngblut e seus respectivos hospedeiros. | 86 |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 Macacos bugios | 21 |
| 1.2 Microbiotas e microbiomas de primatas | 23 |
| 1.3. Abordagens para o estudo de microbiotas e microbiomas..... | 26 |
| 1.4 Motivação e Objetivos | 29 |
| CAPÍTULO 2: DESCRIÇÃO DO GENOMA DE DOIS ISOLADOS BACTERIANOS CULTIVADOS A PARTIR DE FEZES DE MACACOS BUGIOS | 32 |
| 2.1 Metodologias..... | 32 |
| 2.1.1 Coleta de amostras fecais de macacos bugios para isolados bacterianos | 32 |
| 2.1.2 Isolamento de bactérias em condições de microaerofilia | 32 |
| 2.1.3 Identificação taxonômica (gene rRNA 16S bacteriano) | 33 |
| 2.1.4 Implementação digital da coleção de isolados | 34 |
| 2.1.5 Sequenciamento do genoma de dois isolados bacterianos da coleção..... | 34 |
| 2.1.6 Montagem e anotação dos genomas bacterianos | 35 |
| 2.1.7 Classificação taxonômica e análise comparativa..... | 35 |
| 2.1.8 Números de acesso das sequências genômicas | 36 |
| 2.2 Resultados | 37 |
| 2.2.1 Finalização da coleção de isolados bacterianos de macacos bugios | 37 |
| 2.2.3 Genoma do isolado HMB01 | 40 |
| 2.2.4 Genoma do isolado HMB02..... | 49 |
| 2.3 Discussão | 53 |
| CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA MICROBIOTA NÃO-CULTIVÁVEL DE FEZES DE BUGIOS DE CATIVEIRO E VIDA LIVRE | 56 |
| 3.1 Metodologias | 56 |
| 3.1.1 Coleta de amostras fecais de macacos bugios | 56 |
| 3.1.2 Extração do DNA fecal e sequenciamento metagenômico | 56 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 3.1.3 | Análises de sequências de <i>amplicons</i> do 16S..... | 57 |
| 3.1.4 | Análises de sequências de metagenômica <i>shotgun</i> | 58 |
| 3.2 | Resultados | 59 |
| 3.2.1 | Métricas de sequenciamento de bibliotecas de <i>amplicons</i> do 16S e de metagenômica <i>shotgun</i> | 60 |
| 3.2.2 | Diversidade alfa e beta..... | 62 |
| 3.2.3 | Perfil taxonômico..... | 64 |
| 3.2.4 | Análise funcional de metagenomas <i>shotgun</i> e de MAGs | 77 |
| 3.2.5 | Busca por genes de resistência a antibióticos..... | 82 |
| 3.3 | Discussão | 82 |
| 3.3.1 | Diversidade e composição microbiana | 82 |
| 3.3.2 | Recuperação de genomas bacterianos (MAGs)..... | 85 |
| 3.3.3 | Perfil funcional e análise de genes de resistência..... | 88 |
| | CONCLUSÃO | 91 |
| | REFERÊNCIAS | 92 |
| | ANEXOS | 107 |

Neste capítulo apresentamos aspectos da biologia dos bugios e de microbiotas e microbiomas de primatas, bem como de abordagens para seu estudo.

1.1 Macacos bugios

Os bugios (Primatas: Família Atelidae, Subfamília Alouattinae, Gênero *Alouatta*) estão entre os maiores macacos do Novo Mundo, e tem como habitat as ecorregiões neotropicais do centro do México até o nordeste da Argentina. São animais sociais, apresentam grandes variações na composição sexo-etária de seus grupos, e os machos são maiores que as fêmeas. Algumas espécies apresentam dicromatismo sexual na pelagem. Os bugios apresentam-se geralmente em grupos pequenos, 2 a 10 indivíduos, e são territorialistas. Essas características, todavia, são dinâmicas, pois as áreas ocupadas por uma espécie podem variar em relação ao tamanho do grupo, à categoria trófica a que pertence e em relação à produtividade do habitat. Uma característica marcante do gênero *Alouatta* é seu uivo ou grito audível a quilômetros de distância, traduzida em seu nome popular de macaco gritador (*howler monkey*). Os bugios alimentam-se de frutos, folhas, flores, brotos e sementes, e desempenham importante papel na regeneração de florestas sendo dispersadores de sementes cuja germinação é aumentada após passagem pelo trato digestório desses animais (Wilson & Reeder, 2005; Gregorin, 2006; Kowalewski *et al.*, 2014; Chaves & Bicca-Marques, 2017; Fergnani *et al.*, 2020; Bravo, 2022; Fuzessy *et al.*, 2022).

Os estudos do arranjo taxonômico do gênero *Alouatta* reconhecem até dez espécies e vinte subespécies de bugios, e são ainda controversos. Várias espécies de bugios já foram registradas na Floresta Amazônica dos estados do Maranhão, Pará e Piauí e na Mata Atlântica nordestina tais como *A. belzebul*, *A. discolor* e *A. ululata*, além de espécies endêmicas da Mata Atlântica do sudeste, do Cerrado e Pantanal como *A. guariba* e *A. caraya*. Por outro lado, a espécie *A. pigra* (bugio preto) é típica da América central, e não há registro dessa espécie nos biomas brasileiros (Auricchio, 1995; Rylands, 2000; Wilson & Reeder, 2005; Gregorin, 2006; SiBBr, 2022).

A espécie *A. guariba* (bugio-ruivo) compreende duas subespécies: *A. guariba guariba*, que tem sua ocorrência restrita ao norte do Rio Doce, nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais, e *A. guariba clamitans* que é encontrada no sul do Espírito Santo e sudeste de

Minas Gerais até o nordeste do Rio Grande do Sul, sempre associado à Mata Atlântica (Rylands, 2000; Gregorin, 2006). São animais herbívoros generalistas, estima-se que eles obtém até 30% da energia diária a partir de processos fermentativos oriundos da microbiota intestinal, sendo que a dieta com alto conteúdo de fibras (40%) é indicada para aumentar a produção de SCFA (*Short Chain Fatty Acids*) (Milton & McBee, 1983; Carneiro *et al.*, 2021). Os SCFAs acetato, propionato e butirato são os principais metabólitos produzidos pelas bactérias do intestino, que além de serem importante fonte de energia para o hospedeiro, exercem outros efeitos fisiológicos relevantes (Portincasa *et al.*, 2022).

A espécie *A. caraya* (bugio-preto-e-ruivo) é encontrada principalmente no Brasil, no Cerrado e Pantanal, e em áreas limítrofes da Bolívia, Paraguai e Argentina. Uma das mais destacadas características dessa espécie é seu acentuado dicromatismo sexual, em que os machos adultos são completamente pretos e as fêmeas e juvenis são de cor amarelada. *A. caraya* exige florestas com diversas espécies de plantas para suprir suas necessidades alimentares, porém, grande parte do seu habitat está sendo diminuída pela destruição dessas florestas e construção de represas, observando-se redução da variabilidade genética em algumas populações bem como a migração de indivíduos para áreas urbanizadas (Hirsch *et al.*, 2002; Oklander *et al.*, 2017; Jardim *et al.*, 2020; Duffy *et al.*, 2022; Oklander *et al.*, 2022).

Os bugios ruivos voltaram para a lista de espécies ameaçadas de extinção em 2017 após o surto de febre amarela. Macacos do gênero *Alouatta* são mais sensíveis ao vírus da febre amarela do que macacos de outros gêneros. Além das mortes por febre amarela, os bugios também sofreram com ações de violência humana que resultaram em uma dramática redução da sua população em diferentes regiões do Brasil (Andrade, 2018; Boulos & Gatti, 2018; Estrada *et al.*, 2018; Moriyama, 2018; Possamai *et al.*, 2022). O repovoamento de bugios em seus habitats naturais após sua procriação em zoológicos e centros de conservação de animais silvestres é uma alternativa aparentemente viável (Idoeta, 2015; ND+, 2020), mas que dependerá tanto da aplicação de metodologias de reintrodução como de mais estudos sobre os hábitos e a fisiologia desses animais.

As estratégias de conservação de primatas requerem abordagens multifacetadas que incluem o estabelecimento de centros de conservação, reprodução em cativeiro e programas de reintrodução. Dentre os aspectos da fisiologia de animais silvestres, o microbioma tem emergido com um componente relevante a ser considerado no planejamento de estratégias de conservação e práticas de manejo, uma vez que tem potencial para revelar condições de saúde, doenças, nutrição, comportamento e história de vida desses animais bem como perturbações no

seu habitat (Amato *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015; Amato *et al.*, 2016b; Bahrndorff *et al.*, 2016; Stumpf *et al.*, 2016; Peixoto *et al.*, 2021; Quiroga-González *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021; Dallas & Warne, 2022).

1.2 Microbiotas e microbiomas de primatas

O termo microbiota é utilizado para designar a comunidade de espécies microbianas dos diferentes domínios da vida (Bacteria, Archaea, Protozoa, Fungi, Algae) presente em um dado ambiente, sendo que não inclui os vírus. O termo microbioma refere-se a microbiota existente em um habitat bem-definido, compreendendo além das espécies de microrganismos, os seus compostos e metabólitos, *relic* DNA, vírus, plasmídeos e elementos genéticos móveis encontrados em um nicho específico em uma condição ambiental determinada (Whiteside *et al.*, 2015; Berg *et al.*, 2020; Rosenberg, 2021). Não é incomum que estes termos sejam utilizados como sinônimos, ou que apresentem definições mais restritas. Por exemplo, alguns autores definem microbioma como a coleção de genomas da microbiota de um ambiente (Schlaeppli & Bulgarelli, 2015; Taneja, 2017).

As microbiotas compreendem microrganismos geneticamente diversos e variam consideravelmente entre ambientes, espécies hospedeiras, genótipos dos hospedeiros, órgãos, idade, tipos de dieta e histórias de vida (Ley *et al.*, 2008; Segata, 2015; Bletz *et al.*, 2016; Wasimuddin *et al.*, 2017; Baniel *et al.*, 2021; Levin *et al.*, 2021; Mallott & Amato, 2021; Rosenberg, 2021; Yao *et al.*, 2021; de Jonge *et al.*, 2022; Martino *et al.*, 2022). Microbiotas produzem diversos compostos que impactam, geralmente beneficemente, seus hospedeiros e ambientes (Backhed, 2011; Spor *et al.*, 2011; Sharon *et al.*, 2014; Koh *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022).

Dentre as microbiotas e microbiomas que tem recebido mais atenção estão os de seres humanos, em particular do intestino humano (Rosenberg, 2021). O projeto microbioma humano determinou a coleção de microrganismos associados a diferentes tecidos de indivíduos saudáveis (Nelson *et al.*, 2010; Schloissnig *et al.*, 2013; Lloyd-Price *et al.*, 2017). O número de espécies microbianas que habitam o intestino humano varia de 2000 a 20000, dependendo da abordagem metodológica empregada e da variedade de amostras fecais analisadas (Almeida *et al.*, 2019; Nayfach *et al.*, 2019; Rosenberg, 2021). Além disso, há estudos que relacionam alterações na microbiota gastrointestinal com disfunções metabólicas tais como inflamação

crônica do intestino, diabetes mellitus do tipo 2, obesidade e desordens neurológicas (Carr *et al.*, 2016; Utschneider *et al.*, 2016; Cryan *et al.*, 2019; Sultan *et al.*, 2021).

Cabe destacar que maioria dos estudos as amostras fecais são frequentemente utilizadas como representativas da microbiota intestinal, pela facilidade de coleta não invasiva. Entretanto, essa aproximação requer cautela uma vez que a microbiota fecal pode não representar a microbiota associada à mucosa intestinal (Tang *et al.*, 2020). Por outro lado, foi observada variação mínima na diversidade e composição da microbiota ao longo do trato gastrointestinal de macacos colobos, indicando que a análise da microbiota fecal parece ser suficiente para descrever a microbiota intestinal desse grupo de primatas (Amato *et al.*, 2016b).

Aspectos de microbiotas e microbiomas de primatas não-humanos também têm sido explorados. Por exemplo, a comparação da microbiota fecal de espécies de homínídeos mostrou que os microbiomas divergiram ao longo da evolução dessas espécies e revelou que os microbiomas humanos sofreram redução em sua diversidade microbiana em relação ao de gorilas, chimpanzés e bonobos (Ochman *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2010; Moeller *et al.*, 2014; Nishida & Ochman, 2019). Também tem sido de interesse a comparação da microbiota de diferentes tecidos/órgãos de primatas assim como realizados para humanos (Li *et al.*, 2020; Kitrinos *et al.*, 2022). Outro aspecto de interesse, é o entendimento da contribuição da microbiota para extrair suficiente energia de dietas de digestão difícil, como é o caso de primatas folívoros (Amato *et al.*, 2016b). Além disso, o estudo comparativo da microbiota intestinal de primatas em cativeiro e selvagens tem sido utilizado para indicar estado de saúde e risco de disbiose intestinal (Amato *et al.*, 2016b; Su *et al.*, 2016; Hale *et al.*, 2019). Variações na abundância de *Akkermansia* (ação anti-inflamatória) e de potenciais patógenos como *Desulfovibrio* e *Methanobrevibacter* em macacos colobos foram correlacionados a saúde e risco aumentado de disbiose (Amato *et al.*, 2016b). Há relato de que a microbiota intestinal de *Macaca mulatta* em cativeiro possui maior diversidade e abundância de genes de resistência a antibióticos (Jia *et al.*, 2022). Esta classe de genes também verificada na microbiota de *Macaca fascicularis* reflete variações na dieta (Yan *et al.*, 2022).

Em bugios-pretos (*A. pigra*), já foi verificado que ocorre uma variação na microbiota intestinal de indivíduos oriundos de diferentes habitats no México (fragmento de floresta tropical, floresta semidecídua, floresta tropical contínua e cativeiro) (Amato *et al.*, 2013). Além disso foi observado que os indivíduos de um mesmo grupo social apresentam similaridades entre suas microbiotas, com abundâncias relativas de membros dos gêneros *Bacteroides*,

Clostridium e *Streptococcus* mais similares em indivíduos que passam mais tempo em contato próximo (Amato *et al.*, 2017).

A composição e diversidade da microbiota hidrogenotrófica é reduzida em bugios-pretos (*A. pigra*) de cativeiro que recebem uma dieta pobre em fibras comparada à de animais selvagens (Nakamura *et al.*, 2011). Em estudos subsequentes, foi demonstrado que animais submetidos a dieta menos variada apresentam menor diversidade microbiana intestinal (Amato *et al.*, 2015). Por outro lado, existem diferenças importantes no perfil taxonômico de microbiotas de machos adultos, fêmeas adultas e juvenis, as quais não estão diretamente relacionadas com a dieta. Enquanto fêmeas juvenis tem uma microbiota intestinal caracterizada por bactérias do filo Firmicutes, como *Roseburia* e *Ruminococcus*, fêmeas adultas tem uma maior razão Firmicutes em relação a Bacteroidetes, além de apresentarem *Lactococcus*, que tem sido associado a produção de folato, cofator na produção de serotonina (Amato *et al.*, 2014). A pesquisa por *Bifidobacterium* em fezes de bugios-pretos de vida livre revelou a presença *B. longum*, e foi sugerido que sua presença seja benéfica para a saúde desses animais e que poderia ser utilizado como probiótico em animais de cativeiro (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2019).

Assim como verificado para microbiota de homínídeos (Ochman *et al.*, 2010), a comparação da microbiota de duas espécies de bugios (*A. pigra* e *A. palliata*) centro-americanos revelou que o efeito da espécie hospedeira na microbiota intestinal é maior do que o efeito do tipo de floresta que habitam e de variações sazonais ou perturbações no ambiente (Amato *et al.*, 2016a). Outros trabalhos confirmam que distintas espécies de primatas possuem diferenças importantes na composição de suas microbiotas, porém tais microbiotas são fortemente impactadas pela degradação do habitat e por mudanças na dieta, demonstrando sua plasticidade composicional (Hale *et al.*, 2016; Hale *et al.*, 2018; Hicks *et al.*, 2018; Amato *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2019; Barelli *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020b; Narat *et al.*, 2020; Baniel *et al.*, 2021; Quiroga-González *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2022). Por exemplo, variações sazonais que aumentam a disponibilidade de frutas refletem diretamente no aumento da abundância de Clostridia e *Prevotellaceae* e diminuição de *Treponema* na microbiota de gorilas selvagens (Hicks *et al.*, 2018).

Variações no perfil de metabólitos fecais de bugios-pretos (*A. pigra*) estão fortemente associadas a variações no consumo de metabólitos de plantas, mas não se correlacionam com variações sazonais observadas na composição da microbiota (Mallott *et al.*, 2022). Em outro estudo, também com indivíduos de *A. pigra*, foi mostrado que a elevação de níveis de metabólitos de glicocorticoides fecais como indicador de estresse por diminuição da

disponibilidade de alimentos está associada a variações na composição da microbiota (Martinez-Mota *et al.*, 2022).

1.3. Abordagens para o estudo de microbiotas e microbiomas

A microbiota de diferentes ambientes, tais como solos, oceanos, compostagem, tecidos animais e vegetais, tem sido explorada há décadas por meio **de abordagens-dependentes-de-cultivo**, que compreendem técnicas convencionais para cultivo laboratorial e isolamento de linhagens de microrganismos procarióticos e eucarióticos. O isolamento é importante porque abre a possibilidade da identificação taxonômica destas linhagens e da caracterização de seus atributos microbiológicos, fisiológicos, bioquímicos, genômicos, biotecnológicos e terapêuticos (Zhang & Xu, 2008; Vartoukian *et al.*, 2010; Torres-Maravilla *et al.*, 2022).

Entretanto, postula-se que a vasta maioria (95-99%) das espécies microbianas presentes em um determinado nicho ecológico não é cultivável através dos métodos clássicos, pois devem requerer condições de cultivo ainda desconhecidas. Essa premissa foi baseada na discrepância observada entre o número total de células estimado por microscopia e o número de células cultiváveis na amostra analisada. Essa discrepância é conhecida como “*great plate count anomaly*” (Amann *et al.*, 1995; Vartoukian *et al.*, 2010). Tal constatação tornou evidente a necessidade de novos métodos para acessar a riqueza microbiana de forma mais completa, e os microbiologistas ambientais começaram a utilizar **abordagens moleculares-independentes-de-cultivo** para estudo da composição e distribuição de comunidades microbianas na biosfera, principalmente pela análise da sequência de genes do rRNA amplificados diretamente do DNA da amostra ambiental e submetidos a clonagem molecular (Pace, 1997; Tringe & Hugenholtz, 2008; Hugerth & Andersson, 2017).

Neste cenário surge, em 1998, o termo metagenoma para designar os “genomas coletivos da microflora de solo” (Handelsman *et al.*, 1998). Essa abordagem passou a ser designada de metagenômica funcional e compreende as seguintes etapas: isolamento e purificação do DNA de uma amostra complexa; clonagem do DNA em um vetor apropriado; transformação de célula hospedeiras para obtenção da biblioteca de DNA metagenômico; triagem dos clones para atividades enzimáticas ou fenótipos de interesse (triagem funcional) e sequenciamento de clones selecionados com o método de Sanger, seguindo-se análises bioinformáticas das sequências (Lam *et al.*, 2015).

Dois grandes projetos de sequenciamento de amostras ambientais (Tyson *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004), ainda envolvendo a clonagem prévia de fragmentos de DNA ambiental, marcaram a transição para o que hoje conhecemos como metagenômica *shotgun*, uma abordagem que foi tremendamente impulsionada com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho (HTS, *High-Throughput Sequencing*) (Reuter *et al.*, 2015). Assim, o metagenoma passou a ser decifrado a partir do sequenciamento direto do DNA metagenômico, dispensando as laboriosas etapas de construção de bibliotecas metagenômicas através de clonagem molecular. A **metagenômica *shotgun*** fornece dados (sequências de DNA) em grande escala que são processados e analisados através de ferramentas computacionais que possibilitam o levantamento de microrganismos conhecidos e desconhecidos, a descoberta de genes e de funções preditas além da recuperação de genomas (MAGs, *Metagenome-Assembled Genomes*) da comunidade microbiana em estudo (Kunin *et al.*, 2008; Fierer *et al.*, 2012; Quince *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020a; Frioux *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). É crescente a construção de catálogos de MAGs derivados de microbiotas de diferentes ambientes, incluindo o intestino de diferentes espécies de animais (Nayfach *et al.*, 2019; Lesker *et al.*, 2020; Youngblut *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021; Nayfach *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2021).

As tecnologias de HTS também impulsionaram a caracterização do perfil taxonômico de microbiotas através do sequenciamento direto de *amplicons* de regiões hipervariáveis do gene codificador do rRNA16S, frequentemente referido apenas como **16S** (Hugerth & Andersson, 2017), uma abordagem que por vezes é referida como **metagenômica 16S**. Entretanto, a utilização do termo “metagenômica” para esta abordagem é considerada equivocada, uma vez não que é não avaliado o conteúdo genômico completo da amostra, mas sim de um único gene (Quince *et al.*, 2017). A utilização do gene rRNA16S como marcador filogenético procariótico está consolidada principalmente devido as suas baixas taxas de transferência horizontal e de recombinação gênica, por ser capaz de diferenciar espécies proximamente relacionadas além de ser um gene muito representado em base de dados (Hamady & Knight, 2009; Schloss & Westcott, 2011; Yarza *et al.*, 2014). A análise com esta estratégia possibilita a quantificação de índices de diversidade em uma dada amostra (alfa-diversidade) e entre amostras (beta-diversidade). Os índices de alfa-diversidade retratam a estrutura da comunidade considerando sua riqueza (número de grupos taxonômicos) e uniformidade (distribuição de abundâncias entre os grupos taxonômicos). Os índices de beta-diversidade quantificam a dissimilaridades/similaridades entre comunidades (diferentes

amostras), considerando abundância ou presença/ausência de sequências (Hugerth & Andersson, 2017; Kers & Saccenti, 2022).

O **sequenciamento de amplicons do 16S** é particularmente interessante para determinação do perfil taxonômico de comunidades de microrganismos associadas a hospedeiro, uma vez que, permite o acesso direto ao componente procariótico da microbiota sem a interferência de sequências do genoma do hospedeiro eucariótico, além de requerer menor quantidade de sequências para análise em comparação com a metagenômica *shotgun* (Ludwig *et al.*, 2011; Ranjan *et al.*, 2016). Além disso, ressalvadas as diferenças metodológicas empregadas no sequenciamento de *amplicons* do 16S, esta abordagem possibilita a realização de comparações entre diferentes microbiotas ambientais ou associadas a hospedeiros (Tringe & Hugenholtz, 2008; Hugerth & Andersson, 2017).

Outro aspecto relevante da caracterização de microbiomas através do sequenciamento do 16S é o seu menor custo em relação à metagenômica *shotgun*, o que possibilitou seu emprego em grandes projetos de caracterização de microbiotas e microbiomas (Goodrich *et al.*, 2014). Entre eles, citamos o consórcio *The Earth Microbiome Project* (EMP) iniciado em 2010, com o propósito de construir um catálogo da diversidade não-cultivável do planeta Terra (Gilbert *et al.*, 2014). A meta-análise de perfis taxonômicos de comunidades microbianas milhares de amostras coletadas nos mais variados biomas revelou a extraordinária diversidade de nosso planeta (Thompson *et al.*, 2017). Outra importante iniciativa é o projeto microbioma humano (HMP, *Human Microbiome Project*) mencionado anteriormente e que foi lançado em 2008 pelo National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos. O HMP inicialmente caracterizou e comparou comunidades microbianas de diferentes tecidos (vias nasais, cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e trato urogenital) de 300 indivíduos através do sequenciamento de *amplicons* do rRNA 16S e de metagenômica *shotgun* (Huttenhower *et al.*, 2012; Langille *et al.*, 2013; Lloyd-Price *et al.*, 2016).

Até recentemente, a análise de resultados de sequenciamento de *amplicons* de regiões hipervariáveis do gene do rRNA 16S (tipicamente regiões V1–V3 ou V3–V5) incluía o agrupamento das sequências por similaridade (usualmente 97% de identidade) para formação de uma **OTU** (*Operational Taxonomic Unit*). Uma sequência de cada OTU é selecionada como representativa, a qual é anotada com métodos de classificação taxonômica utilizando-se bases de dados de sequências do 16S. Este tipo de análise tem resolução máxima até gênero ou níveis taxonômicos mais altos, sendo que foram desenvolvidos *pipelines* que realizam a análise completa do conjunto de dados de sequências de *amplicons* de 16S. A metodologia de

agrupamento de OTUs é vantajosa por demandar menor custo computacional, mas é criticada por superestimar proximidades taxonômicas (pelo limiar de 97% de identidade) e pela geração de OTUs espúrias oriundas de erros de sequenciamento HTS (Konstantinidis & Tiedje, 2005; Schloss *et al.*, 2009; Caporaso *et al.*, 2010; Bokulich *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2016; Edgar, 2018).

Atualmente, a estratégia para análise de sequências de amplicons do 16S consiste na seleção de sequências únicas que geram uma ASV (*Amplicon Sequence Variant*) sem a imposição de limiares arbitrários de dissimilaridade e com confiança estatística de que as variantes não representam erros de sequenciamento. Ainda que esta estratégia tenha o risco de atribuir uma única espécie bacteriana a mais de uma ASV devido a variações intragenômicas nas sequências de genes de rRNA16S, ela tem maior reprodutibilidade que a estratégia de agrupamento de OTU e possibilita comparações mais robustas entre os estudos de composição e estrutura de microbiotas (Callahan *et al.*, 2016; Callahan *et al.*, 2017; Schloss, 2021).

Outras abordagens moleculares-independentes-de-cultivo para o estudo de microbiotas e microbiomas, incluem a metatranscritômica, metaproteômica e metabolômica, as quais possibilitam acessar diretamente a atividade funcional e metabólica da comunidade através da identificação dos genes expressos e de metabólitos produzidos (Franzosa *et al.*, 2015; Knight *et al.*, 2018; Peters *et al.*, 2019). Também vale destacar o crescente interesse na ampliação do repertório de espécies microbianas cultiváveis pela integração de metodologias sofisticadas de cultivo de microrganismos e de informações oriundas das abordagens moleculares-independentes-de-cultivo no estudo de microbiotas. Essa abordagem para caracterizar e explorar microbiomas é denominada de *Culturomics* (Lagier *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2016; Alou *et al.*, 2021).

1.4 Motivação e Objetivos

Como discutido nas seções anteriores, a importância do microbioma gastrointestinal na homeostase dos organismos tem sido cada vez mais destacada, e tanto abordagens dependentes e como independentes de cultivo de microrganismos tem sido cruciais para avaliar o efeito da dieta e do ambiente, entre outros fatores, na composição da microbiota intestinal. Um estudo pioneiro publicado em 2008 (Ley *et al.*, 2008) utilizou sequenciamento do 16S para comparar a microbiota fecal de humanos com a de outros 59 mamíferos de dois zoológicos americanos ou de vida livre, e demonstrou que tanto a dieta e como a filogenia influenciam a diversidade

microbiana e que as comunidades bacterianas coevoluíram com seus hospedeiros. Em estudos subsequentes foram verificadas diferenças na microbiota fecal de ursos pardos em cativeiro e de vida livre as quais foram associadas a diferenças na dieta em habitats distintos (Schwab *et al.*, 2009; Schwab & Gänzle, 2011).

Até 2011, não havia nenhum estudo comparativo da microbiota intestinal de primatas em cativeiro e de vida livre, utilizando abordagens de metagenômica. Nesse cenário, foi proposto o estudo da microbiota de bugios de cativeiro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e de bugios de vida livre que habitam o fragmento de Mata Atlântica da FPZSP, para verificarmos a influência da dieta e do estilo de vida no microbioma desses primatas. Estes bugios são das espécies *A. caraya* (bugio-preto-e-ruivo) e *A. guariba clamitans* (bugio-ruivo). Ressaltamos que os estudos sobre microbioma de bugios atualmente disponíveis na literatura concentram-se em bugios pretos (*A. pigra*) que são endêmicos da América Central (Amato *et al.*, 2013; Amato *et al.*, 2014; Mallott *et al.*, 2022; Martinez-Mota *et al.*, 2022). A expectativa é que o conhecimento da microbiota intestinal de bugios contribua para a conservação destes primatas em cativeiro e na natureza.

Em estudo prévio ao início dessa Tese, foi realizado o isolamento e triagem de bactérias secretoras de amilases, pectinases, celulasas e proteases a partir de fezes de macacos bugios de cativeiro e de vida livre que habitam a FPZSP, o que resultou na composição de um banco de 400 isolados bacterianos. A caracterização preliminar das bactérias desse banco apontou diferenças relevantes no perfil taxonômico dos isolados de fezes dos bugios de vida livre e de cativeiro (Raquel Riyuzo de Almeida Franco e Julio Cezar F. de Oliveira, dados não publicados). Assim, o **primeiro objetivo** do nosso trabalho de Doutorado foi finalizar e completar o banco de isolados cultiváveis, explorando a diversidade taxonômica e funcional da microbiota cultivável de bugios de cativeiro e vida livre. Dois isolados (sendo um de cativeiro e um de vida livre) foram selecionados para sequenciamento de genoma completo, sendo que um deles (HMB01) foi escolhido por se tratar de uma possível novidade taxonômica, e o outro (HMB02) por ser um isolado com potencial probiótico. Os resultados da caracterização genômica dos isolados HMB01 e HMB02 estão apresentados no **Capítulo 2** desta Tese.

Nosso **segundo e principal objetivo** foi caracterizar a microbiota fecal de bugios de cativeiro e de animais de vida livre que habitam a FPZSP. Para tal, utilizamos o sequenciamento de *amplicons* do gene do rRNA16S e metagenômica *shotgun* a partir do DNA total isolado de fezes desses animais coletadas em 23/09/2013 (primavera/verão), 25/04/2014 (outono/inverno), 02/12/2015 (primavera/verão) e 12/08/2016 (outono/inverno), totalizando 25 amostras. O

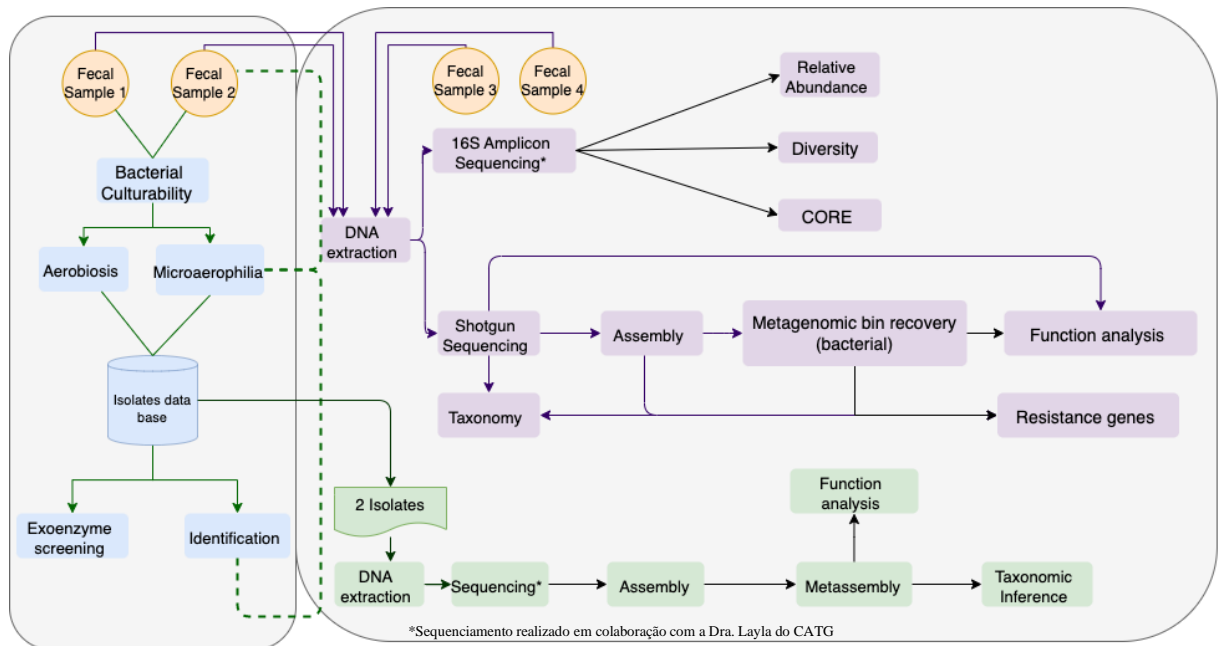
conjunto de dados obtidos nos permitiu explorar a diversidade taxonômica e funcional da microbiota não-cultivável de bugios de cativo e vida livre, identificar genes de resistência a antibióticos e recuperar genomas bacterianos. A análise desses dados mostrou como variações do habitat e dieta podem influenciar na constituição e dinâmica da microbiota gastrointestinal de bugios. Estes resultados estão apresentados no **Capítulo 3** desta Tese.

Fluxo resumido das principais etapas metodológicas

Azul - Estudo anterior (Raquel Riyuzo de Almeida Franco e Julio Cezar F. de Oliveira, dados não publicados).

Verde - Capítulo 2: Descrição do genoma de dois isolados bacterianos cultivados a partir de fezes de macacos bugios

Roxo - Capítulo 3: Diversidade taxonômica e funcional da microbiota não-cultivável de fezes de bugios de cativo e vida livre



CAPÍTULO 2: DESCRIÇÃO DO GENOMA DE DOIS ISOLADOS BACTERIANOS CULTIVADOS A PARTIR DE FEZES DE MACACOS BUGIOS

Neste capítulo apresentamos a conclusão do banco de isolados bacterianos cultivados a partir de fezes de bugios e o sequenciamento e anotação do genoma de dois isolados selecionados desta coleção.

2.1 Metodologias

2.1.1 Coleta de amostras fecais de macacos bugios para isolados bacterianos

A coleta de amostras de material fecal foi realizada nas dependências da FPZSP. As amostras das fezes foram coletadas imediatamente após a defecação com auxílio de palitos de madeira estéreis e transferidas para tubos tipo Falcon (50mL). Uma parte da amostra foi armazenada em ultrafreezer a -80°C , para posterior extração de DNA para análise da microbiota fecal (Capítulo 3), e outra parte foi utilizada para cultivo e isolamento de bactérias de material fecal oriundo de duas coletas:

- 1ª coleta em 23/09/2013 (primavera/verão): 3 amostras de indivíduos de vida livre e 3 amostras de indivíduos de cativeiro.
- 2ª coleta em 25/04/2014 (outono/inverno): 2 amostras de indivíduos de vida livre e 3 amostras de indivíduos de cativeiro.

As informações dos indivíduos da 1ª e 2ª coletas estão descritas no Anexo 1.

2.1.2 Isolamento de bactérias em condições de microaerofilia

O cultivo e isolamento das bactérias cultiváveis em condições de microaerofilia foram realizados pelo plaqueamento em meio de cultura rico sólido BHI (*Brain Heart Infusion*, Himedia®) de 100 μL de diluições seriadas do *pool* de amostras fecais previamente suspensas em solução salina gelada. Foram preparados dois *pools*, um de amostras de fezes de bugios de cativeiro e um de amostras de bugios de vida livre. Para tal, 3g do *pool* de amostras frescas foram suspensos em 27 mL de solução salina e uma diluição 1:10 (1×10^{-1}) foi preparada pela transferência de 1 mL da suspensão inicial para um novo tubo estéril contendo 9 mL de solução salina. O processo foi repetido sequencialmente para obtenção das diluições 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} e 1×10^{-7} . As sete diluições foram plaqueadas e mantidas por

24 horas a 37°C em jarra de anaerobiose (Probac) com capacidade para 12 placas de 90mm e com atmosfera corrigida para microaeróbios e com o gerador microaerobac (Probac), que garante uma atmosfera de 5 e 10% de O₂ e 10% de CO₂. O plaqueamento das diluições 1 × 10⁻¹ e 1 × 10⁻² resultou em um tapete de células nas placas, impossibilitando a obtenção de colônias isoladas. Do plaqueamento das demais diluições, foram selecionadas 99 colônias que foram suspensas em 100µl de glicerol 80% em meio BHI e armazenadas a -80°C, constituindo-se o banco físico de isolados bacterianos de fezes de bugios.

2.1.3 Identificação taxonômica (gene rRNA 16S bacteriano)

Todos os isolados bacterianos foram submetidos a classificação taxonômica pela técnica de MALDI TOF-MS (Brukers Daltonics) segundo as instruções do fabricante. Para isso, 1 µl de cada isolado foi depositado, em triplicata, em poços na superfície da placa de leitura do espectrômetro de massa, seguindo-se adição de 1 µl de uma matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em cada amostra. Após a secagem, foi realizada a aquisição dos espectros. A amplitude dos espectros úteis para identificação de microrganismos é de 2.000 a 20.000 KDa. As análises dos espectros obtidos foram realizadas com o software MALDI Biotyper 2.0 (Brukers Daltonics), que realiza o processamento dos espectros e comparação com banco de espectros da Brukers Daltonics. Um valor (*score*) é gerado de acordo com a similaridade ao banco de espectros, sendo que valores de 0,000 a 1,699 são de amostras não identificadas, 1,700 a 1,999 para identificação de provável gênero, 2,000 a 2,299 para confirmação do gênero e provável espécie e 2,300 a 3000 para confirmação de gênero e espécie. Com base no *score* gerado, foi atribuída a classificação taxonômica do isolado bacteriano.

Os isolados que não obtiveram sua classificação taxonômica por meio da técnica de MALDI-TOF-MS, foram submetidos ao sequenciamento de *amplicons* do gene do rRNA16S. Foram utilizados os oligonucleotídeos S-17: 5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3' e A-21: 5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3', onde N = A+T+C+G, W = A+T, H = A +C+ T e V = A+C+G (Klindworth *et al.*, 2013) na amplificação de uma região do gene do rRNA16S em reações de PCR (95°C por 10min; 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55°C por 1 min e 72°C por 1min; 72°C por 7 min). Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até a análise por eletroforese em gel de agarose a 1%, e submetidos a sequenciamento de DNA pelo método de Sanger. Em cada reação de sequenciamento foram utilizados 2 µL de *Big Dye terminator mix* (Perkin Elmer), ~200 ng de DNA (*amplicons*), 9,6 pmol do oligonucleotídeo (mesmos usados na PCR), 3 µL de tampão de sequenciamento 5x em um volume final de 15 µL. A reação foi

incubada 2 minutos a 96 °C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60 °C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100%, acetato de sódio 3M pH 5.0 e glicogênio 1 mg/mL, lavadas com etanol 70% (v/v), desnaturadas a 95 °C por 1 minuto e encaminhadas para sequenciamento automatizado no aparelho ABI PRISM TM 3100 (*Applied Biosystems*) na Central Analítica do IQ-USP. As seqüências obtidas foram submetidas a análise taxonômica utilizando a ferramenta RDP *classifier* (Wang *et al.*, 2007) com banco próprio.

2.1.4 Implementação digital da coleção de isolados

Para compilar e armazenar todos os dados referente a coleção de isolados bacterianos de fezes de bugios, foi criado um banco de dados contendo: Código Interno, Condição (Cativeiro/Vida Livre), Identificação (MALDI-TOF ou 16S), Sequência do *amplicon* do 16S e Informações sobre atividade enzimática secretada (Amilase, Celulase, Protease e Pectinase). Esse banco foi implementado no site do laboratório de bioinformática do IQ-USP (<http://lbi.usp.br/metazoo/>), utilizando o *plugin wpDataTables and Charts Manager for WordPress* e está disponível para consulta interna de nosso grupo de pesquisa.

2.1.5 Sequenciamento do genoma de dois isolados bacterianos da coleção

Foram selecionados dois isolados bacterianos, sendo um de origem de bugios de cativeiro e outro de vida livre, para sequenciamento genômico completo na plataforma MiSeq-Illumina no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG) do IQ-USP. As colônias bacterianas foram reativadas e cultivadas em meio de cultura BHI com atmosfera aeróbica e microaerofílica para os isolados HMB01 e HMB02, respectivamente. Após crescimento por 42h, as células foram precipitadas por centrifugação (12,000 x g por 5 min) e o DNA total foi extraído com *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) seguindo-se uma purificação adicional com *QIAamp mini spin columns* (Qiagen). A pureza e concentração do DNA foram estimadas pela absorbância a 260 nm, 280 nm, e 230 nm no espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). A concentração DNA de cada amostra foi novamente determinada com o *Quant-iT Picogreen dsDNA assay kit* (Thermo Fisher Scientific) previamente a construção das bibliotecas *shotgun* com 35 ng of DNA utilizando-se o *Illumina Nextera DNA library preparation kit* (Illumina). As bibliotecas foram sequenciadas no

equipamento MiSeq-Illumina com o *MiSeq Reagent kit v2* (formato 2 x 250 ciclos 500 ciclos) que resulta em sequências *paired-end* (*read 1* e *read 2*) de até 250 nucleotídeos.

2.1.6 Montagem e anotação dos genomas bacterianos

A montagem dos genomas dos dois isolados bacterianos foi realizada utilizando-se quatro montadores: MIRA v4.9.6 (Chevreux *et al.*, 2004), Spades v3.15.0 (Bankevich *et al.*, 2012), A5 v.20160825 (Coil *et al.*, 2015) e Discovar r52488 (Weisenfeld *et al.*, 2014). Após a montagem, foi feito um refinamento e otimização da montagem *de novo* obtida pelos quatro montadores utilizando o programa Metassembler (Wences & Schatz, 2015). Os parâmetros de montagem foram gerados utilizando o programa CheckM v1.2.0 (Parks *et al.*, 2015) e QUAST (Gurevich *et al.*, 2013).

Os genomas foram anotados com o *pipeline* PROKKA v1.14.5, utilizando o Prodigal (Seemann, 2014) como preditor de genes. Após a anotação, foram realizadas análises funcionais utilizando os bancos de dados COG (Tatusov *et al.*, 2000), KEEG (Kanehisa *et al.*, 2016) e CAZymes (Drula *et al.*, 2021) através do software EggNOG-Mapper v2.1.8 (Cantalapiedra *et al.*, 2021). Os genes de resistência foram previstos usando o Identificador de Genes de Resistência (RGI) v5.1.1 do *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (Alcock *et al.*, 2020). Os genomas também foram depositados no IMG/M (Chen *et al.*, 2019) e anotados utilizando o *pipeline* interno da plataforma.

2.1.7 Classificação taxonômica e análise comparativa

Para atribuição taxonômica inicial, foi utilizado o *software* TYGS (*Type Strain Genome Server*) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019), com banco de dados (LPSN *database*) interno da plataforma (Meier-Kolthoff *et al.*, 2021), o método *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) (Auch *et al.*, 2006) e o *pipeline* do GTDB-tk v.1.7.0 (Chaumeil *et al.*, 2019), que realiza o alinhamento da sequência de aminoácidos de 120 genes bacterianos marcadores usando HMMER (Eddy, 2011).

Nas análises comparativas subsequentes foram incluídos genomas publicamente disponíveis para o mesmo gênero atribuído para cada isolado. Os números de acesso e o ambiente de origem de cada um dos genomas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Informações dos genomas referência extraídos do NCBI para análises comparativas

| Isolado | Número de acesso | Genoma de Referência | Ambiente |
|--------------|------------------|---|-------------------------------------|
| | GCF_000409565.1 | <i>Pseudochrobactrum sp. AO18b</i> | Rúmen |
| | GCF_020341615.1 | <i>Pseudochrobactrum sp. XF203</i> | Arroz selvagem |
| | GCF_018436065.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| | GCF_907164635.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| | GCF_018436125.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| | GCF_907164615.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| HMB01 | GCF_014203195.1 | <i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> | -- |
| | GCF_018436245.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| | GCF_907164595.1 | <i>Pseudochrobactrum algeriensis</i> | Linfonodo (<i>Bos taurus</i>) |
| | GCF_008801715.1 | <i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> | -- |
| | GCF_001939785.1 | <i>Pseudochrobactrum sp. B5</i> | Água do mar contaminada com Cr(VI) |
| | GCF_019464455.1 | <i>Pseudochrobactrum sp. Wa41.01b-1</i> | Água do mar (Antártica) |
| | GCF_003314995.1 | <i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> | -- |
| | GCF_021733655.1 | <i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> | Solo |
| | HMB02 | GCF_001293735.1 | <i>Limosilactobacillus gorillae</i> |

Os valores de hibridização digital DNA-DNA (dDDH) foram calculados usando o servidor *Genome-To-Genome Distance Calculator* (GGDC) (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014) e o valor de ANI (*Average Nucleotide Identity*) foi calculado utilizando o *pipeline* do fastANI v.1.33 (Jain *et al.*, 2018).

A análise de filogenômica foi realizada utilizando o programa Roary (Page *et al.*, 2015), seguido da análise filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança utilizando o programa RaxML (Stamatakis, 2006). Para o isolado HMB01 também foi realizada a análise do pangenoma, utilizando o *pipeline* do anvi'o v7.1 (Eren *et al.*, 2015; Eren *et al.*, 2021). Para determinar o conteúdo de genes únicos e compartilhados entre os genomas, grupos de genes ortólogos foram analisados utilizando o programa OrthoVenn2 (Eren *et al.*, 2021).

2.1.8 Números de acesso das sequências genômicas

As sequências dos genomas dos isolados HMB01 e HMB02 foram depositadas nos bancos de dados GenBank/NCBI e IMG/M com os seguintes números de acesso:

- GenBank/NCBI

HMB01: SAMN08905831

HMB02: SAMN08906172

- IMG/M

HMB01: 2835747584

HMB02: 2835745919

2.2 Resultados

2.2.1 Finalização da coleção de isolados bacterianos de macacos bugios

A coleção inicial contava com 400 isolados bacterianos cultivados a partir de fezes de macacos bugios de cativeiro e vida livre. Dentre estes, 269 isolados derivaram da coleta de primavera/verão (116 cultivados em condição de aerobiose e 153 em condição de microaerofilia) e 131 isolados a partir da coleta de outono/inverno cultivados em condições de aerobiose. Este conjunto de isolados foi triado para atividades secretoras de amilase, pectinase, celulase e protease (Raquel Riyuzo de Almeida Franco e Julio Cezar F. de Oliveira, dados não publicados).

Para completar a coleção, foram isoladas mais 50 colônias de bactérias microaerofílicas a partir de amostras da coleta outono/inverno. Porém, houve perda de viabilidade de 9 destes isolados e, portanto, foram acrescidos à coleção 41 isolados microaerofílicos, sendo 18 oriundos de fezes de animais de cativeiro e 23 de fezes de animais de vida livre. Dos 41 isolados, apenas 2 não tiveram sua classificação taxonômica inferida por MALDI-TOF, como indicado na tabela 2.

Tabela 2: Classificação taxonômica (MALDI-TOF-MS) dos 41 isolados microaerofílicos da coleta de outono/inverno.

| Taxonomia | Cativeiro | Vida Livre | Total |
|-----------------------------|------------------|-------------------|--------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 11 | 21 | 32 |
| <i>Filifactor villosus</i> | 1 | - | 1 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> | 4 | - | 4 |
| <i>Serratia marcescens</i> | - | 2 | 2 |
| Não identificado | 2 | - | 2 |

Todos os isolados da coleção que não tiveram sua classificação taxonômica inferida por MALDI-TOF-MS (n=93), incluindo os 2 isolados supracitados, foram submetidos à

amplificação por PCR e sequenciamento de uma região do gene do rRNA16S bacteriano para inferência taxonômica. O aparecimento de uma única banda íntegra indica que o processo de extração do DNA e amplificação da região alvo foi bem-sucedida (Figura 1A). Das 93 amostras, 11 não apresentaram esse perfil e, desta forma prosseguimos com 82 amostras para o sequenciamento e classificação taxonômica. O sequenciamento de 24 amostras apresentou qualidade insuficiente para classificação taxonômica foi refinada (Tabela 3). Por outro lado, 52 amostras geraram sequências de boa qualidade e tiveram sua classificação taxonômica inferida pelo RDP *classifier* (Figura 1B).

Tabela 3: Classificação taxonômica através do sequenciamento parcial do gene rRNA16S das 24 sequências com baixa qualidade.

| Taxonomia | Cativeiro | Vida Livre | Total |
|---------------------|-----------|------------|-------|
| Bacteria | 4 | 2 | 6 |
| Actinobacteria | - | 1 | 1 |
| Firmicutes | 1 | - | 1 |
| Enterobacteriales | - | 1 | 1 |
| Gammaproteobacteria | 1 | 1 | 2 |
| Lactobacillales | 12 | - | 12 |
| Micrococcales | - | 1 | 1 |

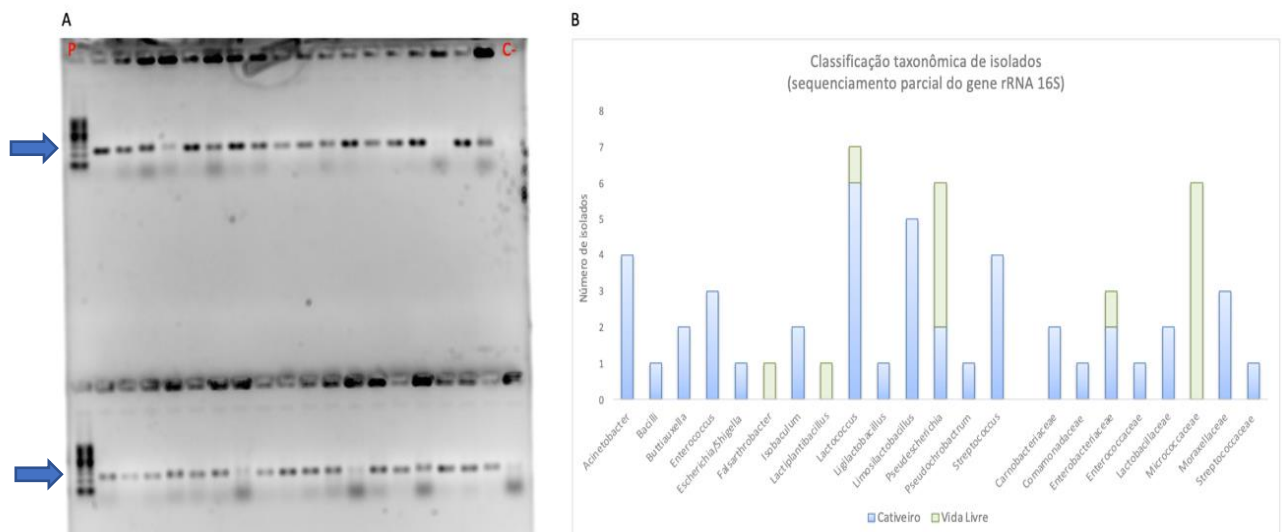


Figura 1: Resultado da amplificação por PCR e inferência taxonômica do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S. A: Avaliação do produto de PCR purificado de parte dos isolados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5mg/μl). O marcador de tamanho está indicado pela letra P e o controle negativo por C-. A seta aponta o *amplicon* de ~580 bp. **B:** Atribuição taxonômica realizada com o classificador RDP *classifier* para 58 sequências de boa qualidade, com o corte de confiança de 0.8. As barras indicam a contagem de bactérias isoladas de fezes de bugios de cativeiro (azul) e de vida livre (verde).

A coleção conta com 441 isolados bacterianos, cultivados em duas condições distintas (aeróbica e microaerofílica) (Tabela 4). Dos 441, 348 isolados (78,73%) foram caracterizados taxonomicamente utilizando a técnica MALDI-TOF-MS e 82 (18,55%) utilizando o sequenciamento parcial do gene rRNA16S. Ao final, 430 de 441 isolados (97,5%) tiveram sua classificação taxonômica inferida. Dos 441 isolados, 342 (118 de cativo e 224 de vida livre) foram classificados em nível de espécie, representando 20 espécies bacterianas. A grande maioria dos isolados bacterianos identificados foi da espécie *Escherichia coli* (n=237), devido ao potencial de crescimento dessa espécie nas condições utilizadas. Apenas as espécies *E. coli* e *S. lutetiensis* foram encontradas tanto em fezes de macacos bugios de cativo e vida livre (Figura 2).

Tabela 4: Distribuição geral dos 441 isolados bacterianos da coleção

| Cativo | | Vida Livre | |
|----------|-----------------|------------|-----------------|
| Aeróbica | Microaerofílica | Aeróbica | Microaerofílica |
| 95 | 92 | 152 | 102 |
| 187 | | 254 | |
| 441 | | | |

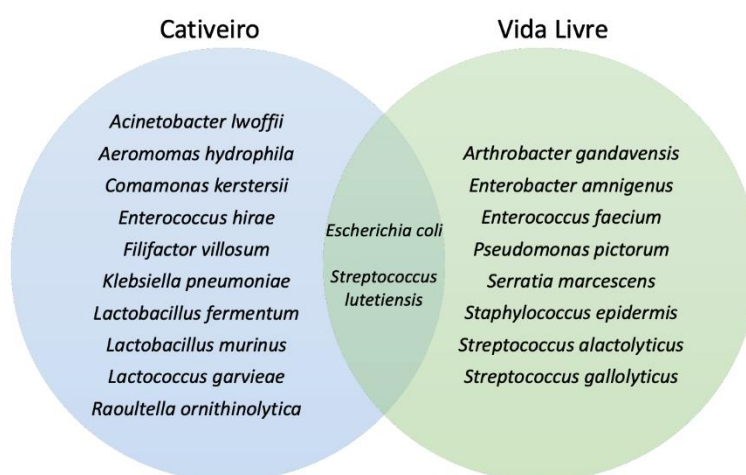


Figura 2: Isolados identificados a nível de espécie. As espécies bacterianas cultivadas a partir de fezes de animais de cativo (azul) e vida livre (verde) estão indicadas no diagrama.

Todas as informações referentes aos 441 isolados bacterianos foram compiladas e indexadas ao banco de dados (Figura 3) disponibilizado no site do Laboratório de Bioinformática do IQ-USP (<http://lbi.usp.br/metazoo/>), cujo acesso é restrito ao nosso grupo de pesquisa.

Dois isolados da coleção, sendo um do material de feecal de bugios de vida livre (HMB01) e outro de bugios de cativeiro (HMB02), foram selecionados para sequenciamento total do genoma, conforme detalhado a seguir.

The image displays two screenshots of the 'Banco de dados isolados - Bugio' website. The left screenshot shows the main interface with a search bar and a table of isolates. The right screenshot shows a detailed search result for a specific isolate, displaying sequence data and taxonomic information.

| COÓDIGO | CONDICAO | CATIVEIRO-VIDA LIVRE | MALDI-TOF | IDC |
|---------|----------|----------------------|----------------------------|-----|
| BG3300 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3301 | Aerobia | C | Raoultella ornithinolytica | 0 |
| BG3302 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3303 | Aerobia | C | Enterococcus hirae | 0 |
| BG3304 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3305 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3306 | Aerobia | C | Acinetobacter baumannii | 0 |
| BG3307 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3308 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |
| BG3309 | Aerobia | C | Escherichia coli | 0 |

| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
|----------|----------|----------|----------|
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |
| PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS | PRODUTOS |

Figura 3: Banco de dados de isolados de material fecal de bugios. Ilustração do banco de dados de isolados bacterianos de fezes de macacos bugios, disponível em: <http://lbi.usp.br/metazoo/>.

2.2.3 Genoma do isolado HMB01

O isolado BG3343 cultivado a partir de fezes de bugios de vida livre foi renomeado como cepa HMB01 para uniformização. O isolado não teve sua classificação taxonômica inferida por MALDI-TOF-MS e o sequenciamento parcial do gene rRNA16S não possibilitou identificação em nível de espécie. A sequência apresentou identidade >97% com 4 espécies de *Pseudochrobactrum* e 96,79% com a espécie *Brucella endophytica* em comparações com a

ferramenta BlastN (Altschul *et al.*, 1990) em análises realizadas em nov/2016. Estes resultados orientaram a escolha desse isolado para sequenciamento do genoma.

2.2.3.1 Métricas da montagem do genoma

O refinamento da montagem do genoma, com a utilização de 4 montadores distintos, demonstrou uma consistente e substancial melhora na qualidade final dos *contigs* gerados, como indicam os parâmetros N50 e número de *contigs* >1000pb (Tabela 5). Ao final, o genoma da cepa HMB01 foi montado em 20 *contigs* (>1000pb), possui um tamanho estimado de 3.876.061 pb e conteúdo GC de 51,71%. O genoma apresenta 0,00% de contaminação e 99,18% de completude.

Tabela 5: Métricas da montagem do genoma da cepa HMB01 com quatro montadores (A5, Discovar, Mira e Spades) e após refinamento com o *software* Metassembler.

| Métricas | A5 | Discovar | Mira | Spades | Metassembler |
|----------------------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| # contigs | 26 | 41 | 123 | 65 | 20 |
| # contigs (>= 1000 pb) | 22 | 22 | 121 | 22 | 20 |
| # contigs (>= 5000 pb) | 18 | 16 | 107 | 16 | 15 |
| # contigs (>= 10000 pb) | 18 | 14 | 97 | 15 | 14 |
| # contigs (>= 25000 pb) | 13 | 11 | 51 | 12 | 11 |
| # contigs (>= 50000 pb) | 10 | 9 | 23 | 9 | 9 |
| <i>Largest contig</i> | 860707 | 889294 | 186531 | 860463 | 889294 |
| <i>Total length</i> | 3880777 | 3878545 | 3875315 | 3879573 | 3876061 |
| N50 | 392682 | 542316 | 51633 | 404940 | 542316 |
| N75 | 287329 | 348281 | 27121 | 304682 | 348281 |
| L50 | 4 | 3 | 23 | 3 | 3 |
| L75 | 7 | 5 | 50 | 6 | 5 |
| GC (%) | 51.71 | 51.71 | 51.72 | 51.71 | 51.71 |
| <i>Mismatches</i> | | | | | |
| # N's | 0 | 100 | 159 | 0 | 0 |
| # N's /100 kpb | 0 | 2.58 | 4.1 | 0 | 0 |

Tabela 6: Métricas do genoma do isolado HMB01.

| Métricas | |
|--|--------------|
| Número de <i>reads</i> | 2.938.800 |
| Número de <i>contigs</i> | 20 |
| N50 | 542.316 pb |
| Cobertura de sequenciamento (média) | 199x |
| Conteúdo GC | 51,71% |
| Tamanho estimado (pb) | 3.876.061 pb |
| Genes codificadores de proteínas (CDS) | 3.553 |
| rRNAs | 3 |
| 5S rRNA | 1 |
| 16S rRNA | 1 |
| 23S rRNA | 1 |
| tRNAs | 57 |
| CDS com funções preditas | 2881 |

As análises funcionais forneceram informações sobre a disposição dos genes em subsistemas e vias metabólicas e possibilitaram a busca de genes de resistência a antibióticos (ARGs) e de fatores de virulência. O isolado HMB01 apresentou 170 vias metabólicas, sendo 27 módulos KEGG completos (Figura 4A), entre eles se destacam Metabolismo de Carboidratos (30%), Metabolismo de Nucleotídeo (22%) e Metabolismo de cofatores e vitaminas (15%). Destaca-se também a presença de 123 COGs associados a classe G (transporte e metabolismo de carboidratos), 291 da classe E (transporte e metabolismo de aminoácidos), 246 de transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P), 245 relacionados à transcrição (K) (Figura 4B). Nenhum ARG foi identificado.

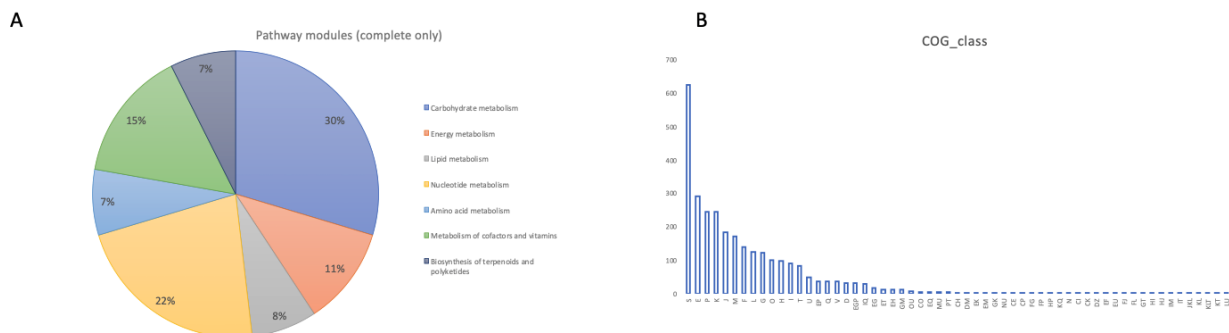


Figura 4: Representação dos módulos metabólicos completos encontrados no genoma do isolado HMB01. **A:** Distribuição de Módulos de vias KEGG (Unidades funcionais de conjuntos de genes em vias metabólicas). **B:** Classificação funcional dos genes COG, as categorias COG são as seguintes: tradução e biogênese (J); processamento e modificação de RNA (A); produção e conversão de energia (C); divisão celular, partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); e mecanismos de defesa (V).

2.2.3.2 Classificação taxonômica e análises comparativas

A classificação taxonômica, utilizando inferências filogenéticas baseadas no gene RNA16S completo com a ferramenta TYGS (Figura 5A) e pelo método *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) (Figura 5B) indicaram que o genoma do isolado HMB01 pertence ao gênero *Pseudochrobactrum*, apresentando um clado consistente (100% de *bootstrap*) com os genomas de referência do banco TYGS-DB.

A classificação taxonômica utilizando 120 genes marcadores e ANI (*pipeline* GTDB-tk) confirmou que o isolado HMB01 pertence ao gênero *Pseudochrobactrum*. HMB01 possui 96,09% de ANI e 0,92 de AF quando comparado à referência *Pseudochrobactrum* sp. B5 (alfa-proteobacteria) GCF_001939785.1 do NCBI. Entretanto apresentou dDDH < 70% em relação a esta cepa de referência, o que é indicativo que não é HMB01 é uma espécie distinta. Os valores adotados para determinar que duas bactérias pertencem à mesma espécie são ANI >96% e dDDH >70% (Richter & Rosselló-Móra, 2009; Auch *et al.*, 2010).

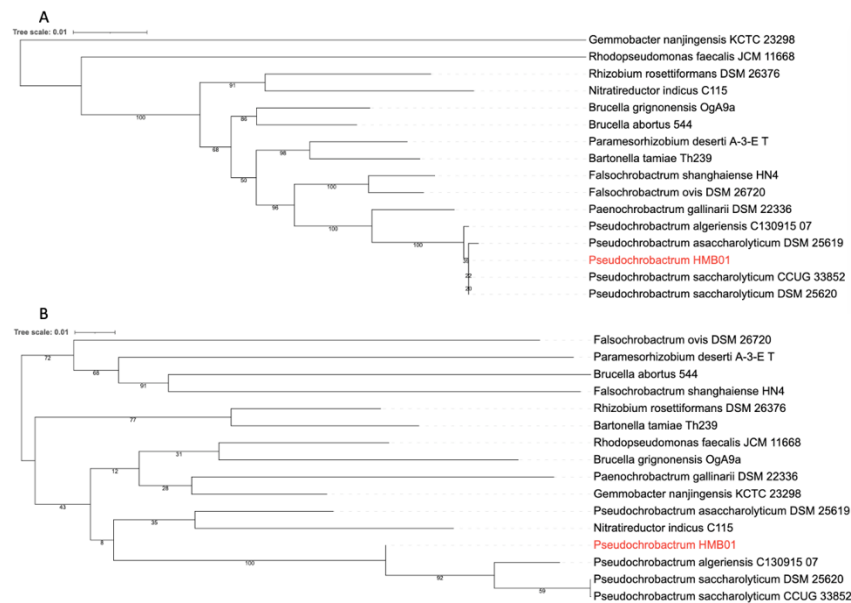


Figura 5: Análise filogenética do isolado HMB01. Análise filogenética utilizando a ferramenta TYGS com banco de dados TYGS-BD para o gene rRNA16S completo (A) e pelo método GBDP (B).

Com o objetivo de chegar na espécie mais próxima do isolado HMB01, criamos um *dataset* de referência com todos os genomas completos do gênero *Pseudochrobactrum* disponíveis no GenBank/NCBI (acesso em 06/2022, n=14). O genoma GCF_000409565 foi excluído das análises por apresentar uma montagem muito fragmentada e de baixa qualidade (Figura 6). Ao final, o nosso *dataset* de referência foi composto por: 2 genomas de *P. saccharolyticum*, 2 genomas de *P. asaccharolyticum*, 6 genomas de *P. algeriensis* e 3 genomas de *Pseudochrobactrum* spp.



Figura 6: Métricas de qualidade para os genomas de referência de *Pseudochrobactrum* spp.. Visualização dos 14 genomas completos do gênero *Pseudochrobactrum* disponíveis no GenBank (acesso em 06/2022), a seta vermelha indica o genoma que foi excluído das análises seguintes.

Iniciamos as análises comparativas do isolado HMB01 com o nosso *dataset* de referência e observamos que o valor de ANI foi superior a 96% quando comparado a duas espécies já descritas: *P. saccharolyticum* e *P. algeriensis*. Também observamos que o valor de ANI foi inferior a 96% quando comparado a espécie *P. asaccharolyticum*, descartando a possibilidade do isolado HMB01 pertencer a esta espécie. Em relação ao valor de dDDH, todos foram inferiores a 70%. O genoma de referência mais próximo do isolado HMB01, considerando os dois parâmetros analisados, foi a montagem GCF_020341615.1 (*Pseudochrobactrum* sp. XF203) sem espécie definida (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de ANI e dDDH do isolado HMB01 com os 13 genomas de *Pseudochrobacterium* disponíveis do GenBank.

| Referência NCBI | HMB01 | | |
|---|-----------------|---------|----------|
| | | ANI (%) | dDDH (%) |
| <i>Pseudochrobacterium</i> sp. XF203 | GCF_020341615.1 | 96,16 | 66,80 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_018436065.1 | 96,15 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_907164635.1 | 96,15 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_018436125.1 | 96,13 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_907164615.1 | 96,13 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium saccharolyticum</i> | GCF_014203195.1 | 96,13 | 66,80 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_018436245.1 | 96,12 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium algeriensis</i> | GCF_907164595.1 | 96,12 | 66,60 |
| <i>Pseudochrobacterium saccharolyticum</i> | GCF_008801715.1 | 96,12 | 66,80 |
| <i>Pseudochrobacterium</i> sp. B5 | GCF_001939785.1 | 96,09 | 66,30 |
| <i>Pseudochrobacterium</i> sp. Wa41.01b-1 | GCF_019464455.1 | 96,05 | 66,30 |
| <i>Pseudochrobacterium asaccharolyticum</i> | GCF_003314995.1 | 87,50 | 30,80 |
| <i>Pseudochrobacterium asaccharolyticum</i> | GCF_021733655.1 | 86,94 | 29,60 |

A filogenômica a partir da análise de coregenoma resultante da comparação dos 11 genomas de referência e do isolado HMB01, mostrou que o isolado HMB01 forma um clado consistente (100% de *bootstrap*) com 5 genomas, sendo 3 deles sem espécie definida (sp B5, sp XF203 e sp. Wa41.01b-1) e 2 da espécie *P. saccharolyticum*. Também observamos que o genoma mais próximo do isolado HMB01 é o genoma GCF_019464455.1, sem espécie definida, formando um clado consistente (100% de *bootstrap*). As duas referências de *P. saccharolyticum* formaram um grupo irmão com o clado supracitado, com 93,7% de *bootstrap*, indicando que o genoma do isolado HMB01 é mais próximo desta espécie do que a espécie *P. algeriensis* (Figura 7A).

A análise de pangenoma (Figura 7B) envolvendo os 4 genomas mais próximos do isolado HMB01 identificou a maior parte do genoma sendo uma região *core* entre os quatro genomas pertencentes ao mesmo gênero bacteriano, além de indicar regiões exclusivas do genoma do isolado HMB01 e regiões compartilhadas exclusivamente com o genoma GCF_019464455.1.

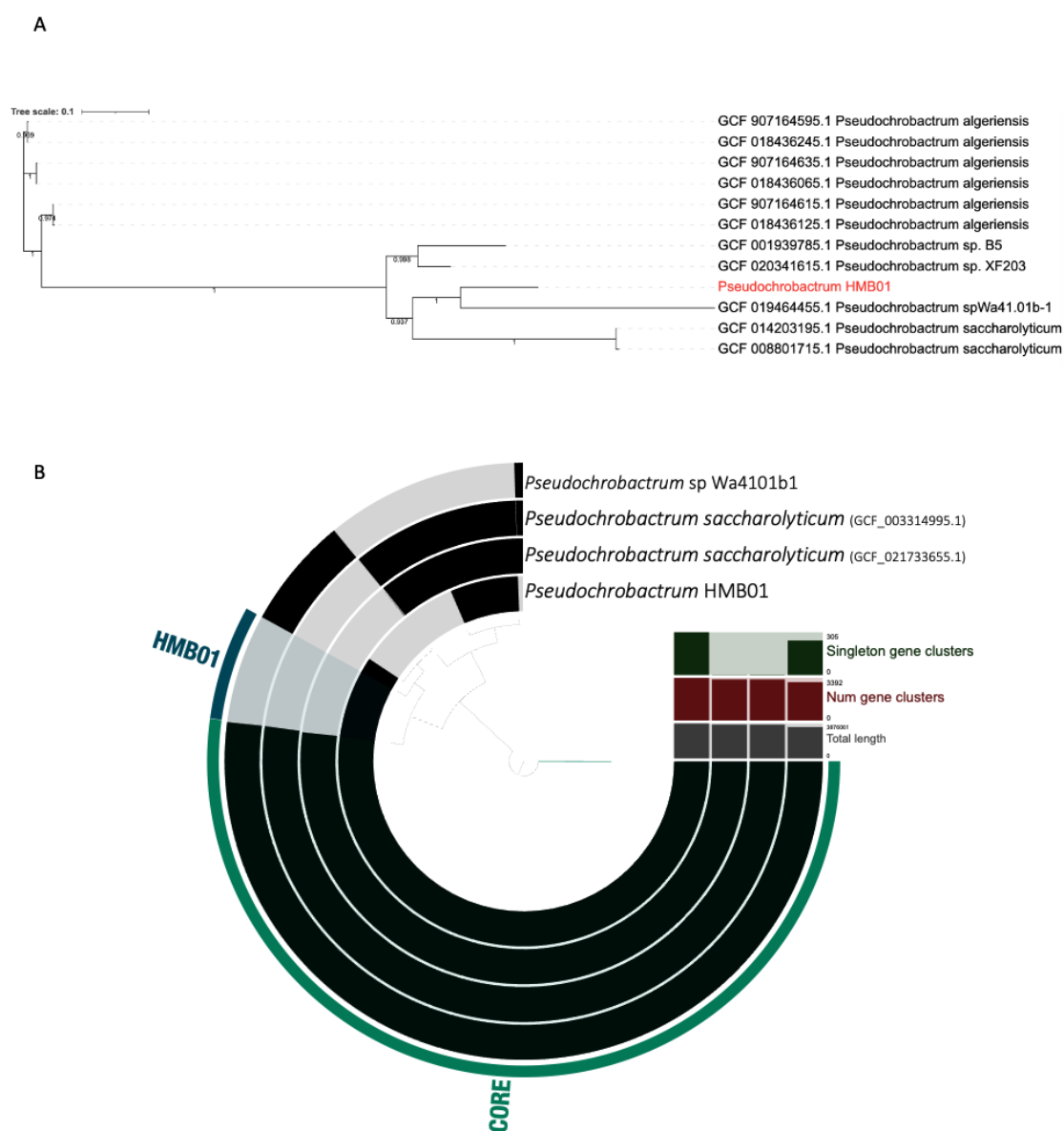


Figura 7: Core genoma. A: Análise filogenética baseada no *core* genoma comparando a cepa HMB01 com as 11 referências do GenBank mais próximas. **B:** O *core* genoma está sinalizado em verde, indicando a região compartilhada entre os 4 genomas. Em azul, destacamos a região *singleton* da cepa HMB01, indicando as regiões únicas do isolado HMB01.

A busca por proteínas ortólogas no isolado HMB01 e nas quatro cepas mais próximas, identificou que os 4 genomas compartilham 2767 *clusters* gênicos contendo 11092 proteínas (Figura 8B). O isolado HMB01 apresentou 74 *clusters* gênicos, contendo 151 proteínas, compartilhado somente com o genoma GCF_019464455 e 10 *clusters* exclusivos. Os *clusters* exclusivos do isolado HMB01 possuem proteínas associadas a processo de modificação de proteínas celulares, resposta ao estresse oxidativo, atividade de S-adenosilhomocisteína desaminase, ligação específica de sequência de DNA e resposta ao íon cádmio.

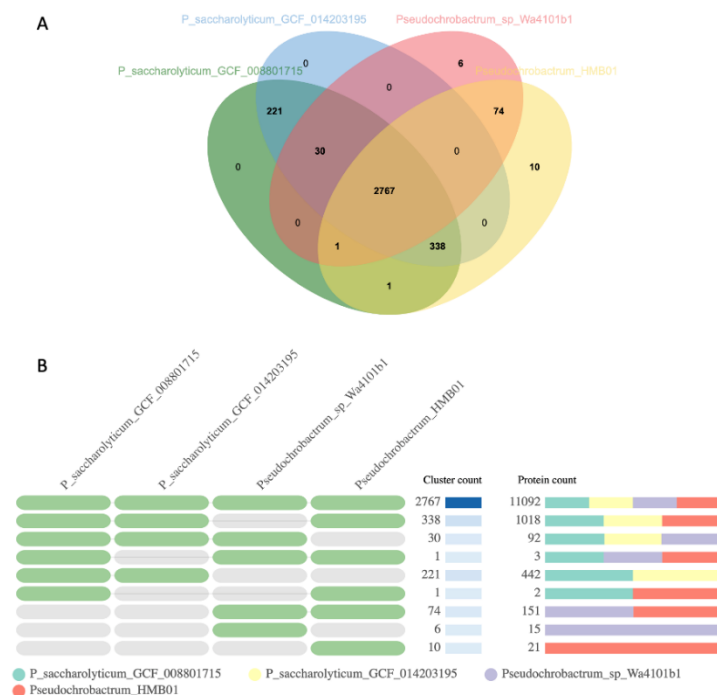


Figura 8: Análise comparativa das proteínas ortólogas entre o isolado HMB01, GCF_008801715.1, GCF_008801715.1 e GCF_019464455 (Wa41.01b-1). A: Diagrama de OrthoVenn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas únicas e compartilhadas de cada genoma. **B:** Contagens de *clusters* e proteínas em diferentes seções do diagrama de Venn, à esquerda os quadros verdes indicam a presença dos clusters e os cinzas indicam ausência, à direita a contagem de clusters compartilhados e a contagem de proteínas referente a cada genoma.

O isolado HMB01, apresentou 25 módulos KEGG completos, dos quais 6 foram exclusivos quando comparado a referência mais próxima *Pseudochrobactrum* sp. Wa41.01b-1 (tabela 8). Destacamos os módulos M00632 e M00554 pertencentes ao metabolismo de carboidratos, que atuam na degradação de galactose e os módulos M00579, M00125, e M00364 que atuam em vias de produção de acetato, riboflavina (vitamina B2).

Tabela 8: Módulos completos de metabólicas do isolado HMB01

| Módulo KEGG | Metabolismo | Descrição |
|-------------|----------------------------|---|
| M00632 | Carboidrato | <i>Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P</i> |
| M00554 | Carboidrato | <i>Nucleotide sugar biosynthesis, galactose => UDP-galactose</i> |
| M00579 | Energia | <i>Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway, acetyl-CoA => acetate</i> |
| M00125 | Cofator e Vitaminas | <i>Riboflavin biosynthesis, plants and bacteria, GTP => riboflavin/FMN/FAD</i> |
| M00140 | Cofator e Vitaminas | <i>C1-unit interconversion, prokaryotes</i> |
| M00364 | Biossíntese de terpenoides | <i>C10-C20 isoprenoid biosynthesis, bacteria</i> |

2.2.4 Genoma do isolado HMB02

O isolado BG3263 cultivado a partir de fezes de bugios de cativo foi renomeado como cepa HMB02 para uniformização. Este isolado foi selecionado por apresentar condições de crescimento em microaerofilia, e inicialmente, não teve sua classificação taxonômica inferida por MALDI-TOF-MS. O sequenciamento parcial do gene rRNA16S também identificou a espécie sendo que apresentou 94% de identidade com rRNA16S de *Lactobacillus gorillae* NR_134066.1, utilizando a ferramenta BlastN (Altschul *et al.*, 1990) em análises realizadas em nov/2016. Estes resultados orientaram a escolha desse isolado para sequenciamento do genoma.

2.2.4.1 Métricas da montagem do genoma

O refinamento da montagem do genoma, com a utilização de 4 montadores distintos, demonstrou uma melhora significativa na qualidade final dos *contigs* gerados, como indicam os parâmetros N50 e número de *contigs* >1000pb (Tabela 9). Ao final, o genoma da cepa HMB02 foi montado em 37 *contigs* (>1000pb), possui um tamanho estimado de 1.647.831 pb e conteúdo GC de 48,07%. O genoma apresentou 0,00% de contaminação e 99,18% de completude.

Tabela 9: Métricas da montagem do genoma da cepa HMB02 com quatro montadores (A5, Discovar, Mira e Spades) e após refinamento com o *software* Metassembler

| Métricas | A5 | Discovar | Mira | Spades | Metassembler |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| # contigs | 71 | 1020 | 55 | 186 | 39 |
| # contigs (>= 1000 pb) | 42 | 238 | 53 | 44 | 37 |
| # contigs (>= 5000 pb) | 35 | 170 | 44 | 35 | 33 |
| # contigs (>= 10000 pb) | 34 | 120 | 42 | 34 | 33 |
| # contigs (>= 25000 pb) | 26 | 38 | 21 | 26 | 24 |
| # contigs (>= 50000 pb) | 9 | 6 | 6 | 9 | 9 |
| <i>Largest contig</i> | 167593 | 54382 | 204809 | 167631 | 167076 |
| <i>Total length</i> | 1651065 | 3285982 | 1617890 | 1636186 | 1647831 |
| N50 | 65853 | 22816 | 46654 | 65407 | 67863 |
| N75 | 32933 | 12577 | 25025 | 33082 | 36140 |
| L50 | 9 | 51 | 8 | 9 | 8 |
| L75 | 19 | 99 | 21 | 19 | 17 |
| GC (%) | 47.96 | 48.03 | 48.08 | 48.06 | 48.07 |
| # N's | 0 | 0 | 108 | 0 | 2 |
| # N's per 100 kpb | 0 | 0 | 6.68 | 0 | 0.12 |

Tabela 10: Métricas do genoma do isolado HMB02

| Métricas | |
|--|--------------|
| Número de <i>reads</i> | 1.703.342 |
| Número de <i>contigs</i> >1000pb | 37 |
| N50 | 67.863 pb |
| Cobertura de sequenciamento (média) | 859x |
| Conteúdo GC | 48,07% |
| Tamanho estimado (pb) | 1.647.831 pb |
| Genes codificadores de proteínas (CDS) | 1.569 |
| rRNAs | 3 |
| 5S rRNA | 1 |
| 16S rRNA | 1 |
| 23S rRNA | 1 |
| tRNAs | 61 |

As análises funcionais forneceram informações sobre a disposição dos genes em subsistemas e vias metabólicas bem como possibilitaram a busca de ARGs e de fatores de virulência. O isolado HMB02 apresentou 170 vias metabólicas, sendo 25 módulos KEGG completos (Figura 9A), entre eles se destacam Metabolismo de Carboidratos (32%), Metabolismo de Nucleotídeo (24%) e Metabolismo de cofatores e vitaminas (16%). Destacamos também a presença de 68 COGs associados a classe G (transporte e metabolismo de carboidratos) (Figura 9B). ARGs e fatores de virulência não foram identificados.

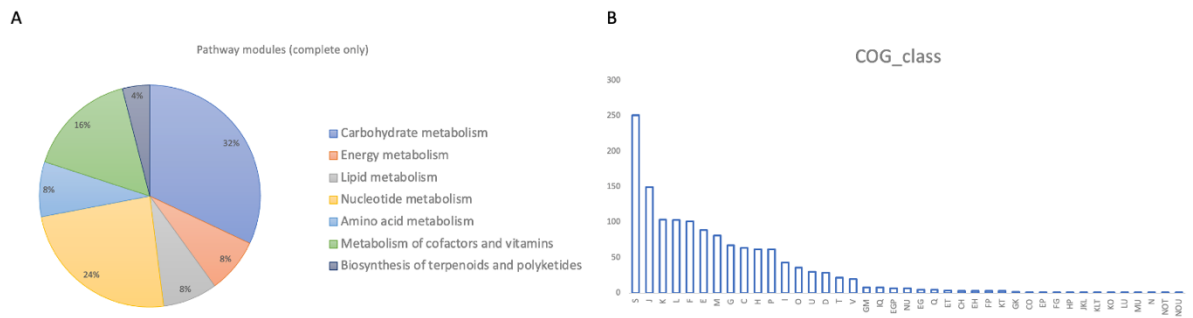


Figura 9: Representação dos módulos metabólicos completos encontrados no genoma do isolado HMB02. A: Distribuição de Módulos de vias KEGG (Unidades funcionais de conjuntos de genes em vias metabólicas). **B:** Classificação funcional dos genes COG, as categorias COG são as seguintes: tradução e biogênese (J); processamento e modificação de RNA (A); produção e conversão de energia (C); divisão celular, partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); e mecanismos de defesa (V).

2.2.4.2 Classificação taxonômica e análises comparativas

A classificação taxonômica inicial utilizando o *software* GTDB-Tk (Chaumeil *et al.*, 2020) revelou que o isolado bacteriano pertence ao gênero *Lactobacillus* (*Limosilactobacillus*) com 99,35% de ANI e 0,93 de AF na comparação com o genoma de referência GCF_001293735.1 (*Limosilactobacillus gorillae* KZ01) disponível no NCBI. O valor de dDDH foi de 95,50 em relação esta cepa de referência. Considerando que os valores adotados para determinar que duas bactérias pertencem à mesma espécie são ANI >96% e dDDH >70% (Richter & Rosselló-Móra, 2009; Auch *et al.*, 2010), concluímos que o isolado HMB02 pertence à espécie *Limosilactobacillus gorillae*.

Quando comparamos as CDSs anotadas dos isolados HMB02 e KZ01, encontramos apenas 3 diferenças, 2 ORFs exclusivas da linhagem KZ01 e 1 ORF exclusiva da linhagem HMB02, as demais ORFs são compartilhadas em ambas linhagens (Figura 10).

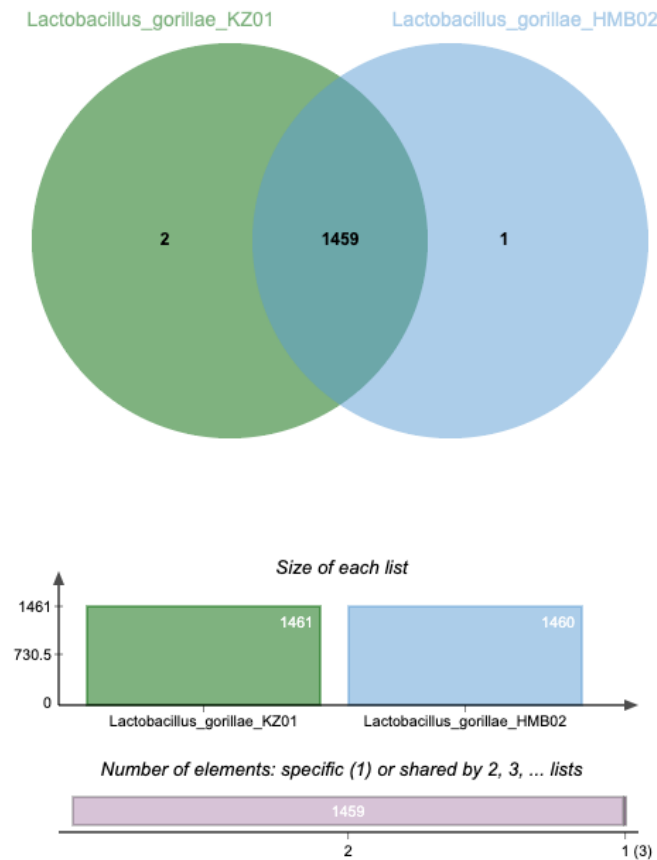


Figura 10: Análise comparativa das proteínas ortólogas entre o isolado HMB02 e KZ01. Diagrama de OrthoVenn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas únicas e compartilhados pelos dois genomas.

A análise comparativa de proteínas ortólogas entre o isolado HMB02 e o único genoma de *Limolactobacillus gorillae* disponível em bancos públicos revelou que o genoma do isolado HMB02 possui um cluster de proteínas exclusivo, o qual contém proteínas da família TnpB, uma endonuclease guiada por RNA (Karvelis *et al.*, 2021). A sequência de aminoácidos das duas CDSs deste *cluster* está apresentada abaixo:

```
>L_gorillae_HMB02|HMEFANML_00027
MQQTLTAKIRLYPTQEQIALFKAVTKEYQRLCNIVSQWYFDGHFNANQKV
FQKDMYRYLRNESPKLNSQMVQSTYRRTVKARYDTRVTRQLDQHPYRYDTGM
IDAKAGKPIWEAVPRTLEWLWKP IHFNRPQADYVHGSNYSFVKERTMISL
NVLGKRIKVPFKADYLADWFATNAKLGTAQLVQLKKHWFLLHVPVTIEVNE
WAKLRNQHIVGIDRGLRQLMTIYDEQGKTKFFNGKRVAYQRKKYAHLRKQ
LQAAGTKSAKRHLKRLAGRENRMEDVNHRLSKTLVQYYGKKTLLFVLEDL
TNVSFDEKNQSTRNRNRDLHSWSFYDLQVKLTYKAQANQSQVLMVSAKYT
```

SQRCPKCGQLHKENRNHALHRYDCASCGFRTNDDRVGAMNLYELGKQYLA
GNEHPKFE LN NVAD

>L_gorillae_HMB02 | HMEFANML_00837
MTKEYQRLCNIVSQWYFDGHFNANQKVFQKDMYRYLRNESPKLNSQMVQS
TYRTVKARYD TVRTQLDQHPYRYDTGMIDAKAGKPIWEAVPRTLEWLWKP
IHFNRPQADYVHGSNYSFVKERTMISLNLVKGRIKVPFKADYLADWFATN
ATLGTAKLVQLKKHWF LHV PVTIEVNEWAKLRNQHI VGI DRGLRQLMTIY
DEQGKTKFFNGKRVAYQRKKY AHLRKQLQAAGTKSAKRHLKRLAGRENRW
MEDVNHRLSKT LVQHYGKNALFVLEDLTNVSFDEKNQNTNRNRDLHSWS
FYDLQVKLTYKAQANQSQVLMVSAKYTSQRCPKCGQLHKENRNHALHRYD
CASCGFRTPFV

A busca por genes relacionados a funções probióticas revelou que o genoma do isolado *Limolactobacillus gorillae* HMB02 apresenta diversas CDSs associadas a propriedades probióticas tais como: *uspA*, *dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*, *ImpB/MucB/SamB*, *clpB*, *clpC*, *msrB*, *luxS*, *MucBP* domain, *fbpA*, and *groS*, *cps1D*, *cps2J*, *ABC transporter*, *ATP-binding protein* (*ABC_tran*, *ABC_tran_CTD*, *ABC_tran_Xtn*), *ABC transporter*, *substrate-binding protein*, *QAT family*, *ABC transporter permease*, *ABC_tran*, *CBS*, *ABC1 family*, *ATP-binding*.

2.3 Discussão

A criação de um banco de isolados bacterianos, com linhagens devidamente catalogadas, armazenadas e crio-preservadas garante o acesso ao microrganismo propriamente dito para caracterização fenotípica detalhada e para determinação de sua sequência genômica. Bancos e Coleções de microrganismos são recursos valiosos para pesquisa e para biotecnologia, e tem papel fundamental na conservação de microrganismos para gerações futuras (Martins *et al.*, 2022). A antiga estratégia de cultivo e isolamento de microrganismos vem retomando seu espaço por possibilitar a obtenção de mais informações fenotípicas dos microrganismos que podem ser associadas a características biológicas do hospedeiro, permitindo uma melhor interpretação de estudos de microbiomas (Bilen *et al.*, 2018). A finalização do Banco de Isolados Bacterianos de Macacos Bugio (BIBMB) consolidou um estoque de linhagens bacterianas nativas que poderão ser adicionalmente caracterizadas e utilizadas em futuras pesquisas, processos e obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

A análises genômicas indicaram que o isolado HMB01 pertence ao gênero *Pseudochrobactrum*, sendo a primeira cepa proveniente de fezes de mamífero. Este gênero,

descrito pela primeira vez em 2006 é composto por 6 espécies: *P. saccharolyticum*, *P. assaccharolyticum*, *P. kiredjaniae*, *P. glaciei*, *P. lubriicis* e *P. algeriensis* (Kämpfer *et al.*, 2006; Kämpfer *et al.*, 2007; Romanenko *et al.*, 2008; IJSEM, 2009; Kämpfer *et al.*, 2009; Loperena-Barber *et al.*, 2022).todas provenientes de amostras ambientais, com exceção do isolado de *P. algeriensis* que foi isolado de linfonodo de gado argelino.

Todas as comparações de dDDH do isolado HMB01 com suas referências ficaram abaixo do limite de espécie recomendado (70%), porém os valores de ANI ficaram ligeiramente acima do limite recomendado (95%) para definição de novas espécies. Este cenário foi semelhante ao retratado por verificado na descrição da espécie *P. algeriensis* (Loperena-Barber *et al.*, 2022). As análises de pangenoma indicaram que o isolado HMB01 está intimamente relacionado com a referência *Pseudochrobactrum* sp. Wa41.01b-1, sem espécie definida e forma um grupo irmão com a espécie *P. saccharolyticum*, podendo ser considerada uma nova espécie com semelhança genômica com o isolado Wa41.01b-1 e intimamente relacionada a espécie *P. saccharolyticum*.

O isolado HMB01 apresentou características funcionais exclusivas quando comparado as referências da literatura, módulos de vias KEGG associadas ao metabolismo de carboidrato, energia e síntese de vitaminas são comumente associadas a microbiota gastrointestinal saudável (Pham *et al.*, 2021).

O isolado HMB02 foi classificado como sendo da espécie *Limosilactobacillus gorillae*, com 99,35% e 95,5 de ANI e dDDH, respectivamente, quando comparado a referência *Limosilactobacillus gorillae* KZ01 (GCF_001293735.1). Esta espécie foi descrita em 2014, sendo que a cepa KZ01 foi isolada de fezes de gorilas do Zoológico de Kyoto (Tsuchida *et al.*, 2014).

A análise comparativa das funções preditas no genoma do isolado HMB02 com o genoma da referência KZ01 mostrou que o isolado HMB02 possui somente um *cluster* proteico exclusivo, o qual inclui proteínas da família TnpB. A proteína TnpB foi recentemente descrita uma nova classe de nuclease uma endonuclease guiada por RNA, apontada como progenitora funcional das nucleases CRISPR–Cas (Karvelis *et al.*, 2021). Até o momento não se demonstrou associação significativa dos *tnpA* (transposase) e *tnpB* com doenças gastroduodenais causadas por *Helicobacter pylori* (Abadi *et al.*, 2014).

Outras características comuns do gênero *Limosilactobacillus*, estão relacionadas a propriedades probióticas e benéficas ao hospedeiro. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do

hospedeiro (Hill *et al.*, 2014; Salminen *et al.*, 2021). Estudos em animais domésticos, animais de produção e animais cativos demonstraram que animais que utilizaram probióticos na alimentação apresentaram melhoras dos sinais clínicos gastrointestinais quando comparados com o grupo controle (Lambo *et al.*, 2021; Mangiaterra *et al.*, 2022).

Genes relacionados a capacidade probiótica foram identificados no genoma de HMB01 tais como genes associados à resposta ao estresse e imunomodulação (*uspA*, *dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*), estresse salino (transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato), proteção do DNA (*ImpB/MucB/SamB* e proteínas da família *clpB*, *clpC*, *msrB*, *luxS*) e capacidade de adesão (*cps1D*, *cps2J* e proteínas de ligação à mucina - domínio MucBP) (Lebeer *et al.*, 2007; Mangiaterra *et al.*, 2022; Syrokou *et al.*, 2022).

A utilização de probióticos multicepas em ruminantes, aves e suínos já foi provada como uma alternativa viável aos antibióticos tradicionais (Lambo *et al.*, 2021). Porém, vale ressaltar que a avaliação de cepas de sete produtos probióticos comerciais no mercado mostrou a presença de genes produtores de metabólitos tóxicos, genes de virulência e genes de resistência a drogas, o que pode representar um risco potencial à saúde (Wang *et al.*, 2021). Este estudo acendeu um alerta para o controle de qualidade e segurança da produção de novos probióticos e propôs que a análise do genoma completo das cepas probióticas é essencial. A análise genômica do isolado HMB02 indicou a ausência de genes relacionados a resistência a drogas, ou qualquer gene que possa representar risco a saúde do hospedeiro. A cepa HMB02 possui características seguras e poderá futuramente ser submetida a testes laboratoriais para caracterização de suas propriedades probióticas.

Do trabalho descrito nesse capítulo concluímos que o isolado HMB01 é um forte candidato a nova espécie do gênero *Pseudochrobactrum*, e que o isolado *Limosilactobacillus gorillae* HMB02 possui características genômicas essenciais para um organismo probiótico. Em ambos os casos são necessários ensaios laboratoriais para confirmar (ou não) estas conclusões.

CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA MICROBIOTA NÃO-CULTIVÁVEL DE FEZES DE BUGIOS DE CATIVEIRO E VIDA LIVRE

*Neste capítulo apresentamos nossos estudos sobre a microbiota de fezes de macacos bugios (*Alouatta spp.*) de cativeiro e vida livre utilizando abordagens metagenômicas*

3.1 Metodologias

3.1.1 Coleta de amostras fecais de macacos bugios

A coleta de amostras fecais de macacos bugio seguiu o protocolo descrito no item 2.1.1. Para as análises descritas nesse capítulo, foram realizadas mais duas coletas (3^a e 4^a coleta), totalizando 4 coletas com 25 amostras de fezes de bugios.

- 1^a coleta: 23/09/2013 (primavera/verão): 3 amostras de indivíduos de vida livre e 3 amostras de indivíduos de cativeiro.
- 2^a coleta: 25/04/2014 (outono/inverno): 2 amostras de indivíduos de vida livre e 3 amostras de indivíduos de cativeiro.
- 3^a coleta: 02/12/2015 (primavera/verão): 3 amostras de indivíduos de vida livre e 3 amostras de indivíduos de cativeiro.
- 4^a coleta: 12/08/2016 (outono/inverno): 4 amostras de indivíduos de vida livre e 4 amostras de indivíduos de cativeiro.

As informações completas dos indivíduos da 1^a, 2^a, 3^a e 4^a coleta estão descritas no Anexo 1.

3.1.2 Extração do DNA fecal e sequenciamento metagenômico

A extração do DNA total de cada amostra fecal foi realizada com *QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)* seguindo as instruções do fabricante, e o DNA purificado foi armazenado a -20°C. As preparações de DNA foram avaliadas e quantificadas pela medida das absorbâncias a 260nm, 280nm e 230nm no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Quantificação adicional foi realizada por meio de leituras de fluorescência em um

espectrofluorímetro (excitação em 480nm e intensidade de emissão medida a 520nm) com a utilização do *QuantiT Picogreen dsDNA Assay Kit* (Invitrogen). A integridade das preparações de DNA foi avaliada por eletroforese capilar no equipamento 2100 *BioAnalyzer* (Agilent Technologies) com *DNA 7500 kit*.

O DNA purificado foi utilizado como molde para obtenção de *amplicons* de 464 pb compreendendo as regiões V3 e V4 do gene do rRNA 16S, amplificados por PCR com o par de *primers* F341/R785, indicado como sendo adequados para análises de diversidade, visto que conseguem cobrir 86% dos filamentos bacterianos conhecidos até então (Klindworth *et al.*, 2013). As bibliotecas de *amplicons* de cada amostra foram indexadas com *kit Nextera Índice XT* (Illumina), purificadas, quantificadas e sequenciadas na plataforma MiSeq-Illumina no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG) do IQ-USP, utilizando-se o protocolo *paired-end* (PE) e o *Illumina MiSeq Reagent kit v2* de 500 ciclos, que possibilita o sequenciamento de 250 bases de cada extremidade dos fragmentos de DNA. Ao final de cada corrida é gerado um arquivo de saída com as sequências (*read1* e *read2*) acopladas a informações da qualidade de cada nucleotídeo sequenciado (arquivo FastQ).

Para sequenciamento *shotgun* na plataforma MiSeq-Illumina, as bibliotecas de fragmentos de DNA foram preparadas com o *Nextera DNA Sample Prep kit*, de acordo com o protocolo do fabricante. As bibliotecas de fragmentos foram quantificadas e sequenciadas na plataforma MiSeq-Illumina, como descrito acima.

3.1.3 Análises de sequências de *amplicons* do 16S

3.1.3.1 Composição e taxonomia

As análises de composição e taxonomia foram realizadas com o *pipeline* QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). As sequências de adaptadores e índices foram eliminadas (*trimmed*) das *reads* brutas com *cutadapt* (Martin, 2011), com parâmetros padrão. A análise de qualidade foi realizada com o programa FastQC (Andrews, 2010), sendo que as sequências do *read2* foram descartadas por apresentarem qualidade muito baixa nas extremidades (Anexo 2). Para geração de ASVs (*Amplicon Sequence Variants*), as sequências processadas do *read1* foram submetidas ao algoritmo DADA2 do *pipeline* QIIME2, com parâmetros padrão (Callahan *et al.*, 2016). O classificador taxonômico foi treinado usando *scikit-learn* do *pipeline* QIIME2 com o banco de dados SILVA v.132 (Quast *et al.*, 2012) para regiões V3 e V4 e usado para classificar as sequências representativas. Para análise do *core-microbiome* (90% e 100% de similaridade) foi

utilizado o *script core-feature* do QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). Para análises de abundância diferencial foi utilizado o programa STAMP com teste estatístico Welch's t-test, e correção Storey-FDR (Parks & Beiko, 2013).

3.1.3.2 Diversidade

As análises de diversidade foram realizadas com *plugins* do *pipeline* QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019), sendo *alpha-rarefaction* e *core-metrics-phylogenetic* para análises de diversidade alfa (*faith_pd*, *evenness_vector* e *feature-observed*) e *unweighted/weighted unifracs* e *bray-curtis* para análises de diversidade beta. Para cálculos estatísticos, foram utilizados os *scripts* *alpha-group-significance* e *beta-group-significance*.

3.1.4 Análises de sequências de metagenômica *shotgun*

3.1.4.1 Montagem de *contigs*

As *reads* brutas (*read1* e *read2*) do sequenciamento *shotgun* foram processadas utilizando o *software* Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) com tamanho mínimo de 100 pb e janela deslizante de 15 pb com qualidade média Q20. Para filtrar sequências do hospedeiro, as *reads* processadas foram alinhadas contra genomas de 3 primatas não-humanos (*Callithrix jacus* (Número de acesso: GCA_001269965.1), *Aotus nancymae* (Número de acesso: GCF_000952055.2) e *Saimiri boliviensis* (Número de acesso: CF_000235385.1), e a referência do genoma humano (Hg38) utilizando o *pipeline* BWA-MEN (Franklin, 2018), com parâmetros padrão. As sequências alinhadas com o hospedeiro foram descartadas, e a *reads* remanescentes foram montadas em *contigs* usando o metaSPAdes (Nurk *et al.*, 2017) com parâmetros padrão. Esta etapa de montagem foi realizada com a colaboração do Dr. Gustavo Ribeiro (IQ-USP).

3.1.4.2 Recuperação de genomas bacterianos

A recuperação dos MAGs (*Metagenome Assembled Genomes*) por realizada com o *pipeline* do Metaras (Uritskiy *et al.*, 2018) que utiliza três algoritmos de *binning*: Metabat2 (Kang *et al.*, 2019), MaxBin2 (Wu *et al.*, 2016) e Concoct (Alneberg *et al.*, 2014). Após refinamento dos *bins*, selecionamos apenas os MAGs com contaminação máxima de 5% e completude mínima de 85%, utilizando o CheckM (Parks *et al.*, 2015). Os MAGs selecionados foram comparados com três catálogos de genomas recuperados de microbiomas: *Unified Human Gastrointestinal Genome* (UHGG) (Almeida *et al.*, 2021), *Genomes from Earth's*

Microbiomes (GEM) (Nayfach *et al.*, 2021) e MAGs do microbioma intestinal de animais vertebrados (Youngblut *et al.*, 2020).

3.1.4.3 Análise taxonômica de *reads*, *contigs* e MAGs

Para a classificação taxonômica de *reads*, foi utilizado o software Kraken 2 (Wood *et al.*, 2019). Para a classificação de *reads* e *contigs* pertencentes a organismos eucarióticos foi utilizado o software CCMetagen (Marcelino *et al.*, 2020). Ambos os classificadores foram utilizados com o banco de dados NCBI-nt (Sayers, 2016). Os MAGs foram submetidos a classificação taxonômica utilizando o software GTDB-tk v. 0.2.2 (Chaumeil *et al.*, 2019) com seu próprio banco de dados.

3.1.4.4 Análise funcional dos MAGs

Os MAGs foram anotados com o *pipeline* PROKKA v1.14.5, utilizando o Prodigal como preditor de genes (Seemann, 2014). Após a anotação, foram realizadas análises funcionais utilizando os bancos de dados COG (Tatusov *et al.*, 2000), KEEG (Kanehisa *et al.*, 2016) e CAZymes (Drula *et al.*, 2021) através do *software* EggNOG-Mapper v2.1.8 (Cantalapiedra *et al.*, 2021). Os genes de resistência foram previstos usando o Identificador de Genes de Resistência (RGI) v5.1.1 do *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (Alcock *et al.*, 2020). Os MAGs também foram depositados no IMG/M (Chen *et al.*, 2019) e anotados utilizando o pipeline interno da plataforma.

3.2 Resultados

Para caracterizar a microbiota fecal de bugios de cativeiro e de animais de vida livre que habitam a FPZSP utilizamos o sequenciamento de *amplicons* do gene do rRNA16S e metagenômica *shotgun* a partir do DNA total isolado de fezes desses animais. Com base nos resultados do sequenciamento de *amplicons* do 16S, descrevemos a diversidade alfa e beta da comunidade bacteriana bem como seu detalhamento taxonômico em nível de filo, família e gênero. O detalhamento da composição taxonômica em nível de espécies bem como de alguns aspectos do potencial funcional do microbioma dos bugios foi analisado a partir das sequências de metagenômica *shotgun*.

3.2.1 Métricas de sequenciamento de bibliotecas de *amplicons* do 16S e de metagenômica *shotgun*

Como detalhado no item no item 3.1.3, para análise de *amplicons* da região V3-V4 do gene do rRNA16, as sequências do *read2* foram descartadas por apresentarem baixa qualidade para análise, uma vez que quando os incluídos na montagem do *amplicon* observamos uma alta taxa de descarte de sequências (Anexo 3), impossibilitando o seguimento das análises com ambos *reads*. Dessa forma, apenas os *reads1* foram utilizados, totalizando 13.388.636 sequências com um comprimento médio de 250 nt. Após a filtragem de qualidade permaneceram 9.072.914 sequências que foram submetidas ao *software* DADA2 v.2019.10. Ao final permaneceram 4.144.543 sequências após filtragem/correção do *software*, resultando uma média de 165.781 sequências por amostra (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado do sequenciamento das bibliotecas de *amplicon* da região V3-V4 gene do rRNA 16S das 25 amostras fecais de bugios de cativeiro (C) e vida livre (NC).

| Sample-ID | Input | Filtered | Denoised | Output |
|---------------|--------|----------|----------|--------|
| C.1.1 | 415608 | 270815 | 262382 | 111102 |
| C.1.2 | 452886 | 309729 | 300992 | 124633 |
| C.1.3 | 540936 | 363755 | 354361 | 148563 |
| C.2.1 | 748651 | 536236 | 521126 | 203558 |
| C.2.2 | 353548 | 162840 | 152774 | 93476 |
| C.2.3 | 620713 | 359034 | 344955 | 179544 |
| C.3.1 | 549044 | 414357 | 402028 | 159085 |
| C.3.2 | 480344 | 362894 | 355858 | 133934 |
| C.3.4 | 577825 | 432453 | 420486 | 163421 |
| C.4.1 | 669164 | 490595 | 485177 | 241320 |
| C.4.2 | 493718 | 330378 | 326654 | 166707 |
| C.4.4 | 404321 | 262637 | 258373 | 133097 |
| C.4.5 | 419948 | 317526 | 312857 | 137781 |
| NC.1.1 | 472148 | 297198 | 287194 | 144588 |
| NC.1.2 | 479137 | 314276 | 302684 | 146484 |
| NC.1.3 | 362980 | 228190 | 219817 | 106505 |
| NC.2.1 | 401423 | 175698 | 162538 | 106210 |
| NC.2.2 | 616626 | 380195 | 362072 | 195371 |
| NC.3.1 | 416650 | 313337 | 304470 | 137538 |
| NC.3.2 | 651720 | 469850 | 457444 | 180606 |
| NC.3.3 | 545211 | 392379 | 380187 | 162774 |

| | | | | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| NC.4.1 | 485575 | 310403 | 306686 | 171201 |
| NC.4.2 | 444619 | 273448 | 269581 | 139873 |
| NC.4.3 | 959412 | 714904 | 707132 | 307536 |
| NC.4.4 | 826429 | 589787 | 584157 | 349636 |
| Total | 1,3E+07 | 9072914 | 8841985 | 4144543 |
| Média | 535545 | 362917 | 353679 | 165782 |

Para análise dos dados de metagenômica *shotgun*, os *reads* brutos (*read1*+*read2*) foram filtrados por qualidade e tamanho ($Q \geq 30$, $pb \geq 50$) e processados para remoção de sequências do hospedeiro antes de serem submetidos a etapa de montagem, como descrito na metodologia item 3.1.4. É importante explicar que algumas amostras de DNA foram reunidas em quantidades equivalentes previamente ao sequenciamento *shotgun*, como indicado na Tabela 12. Após as etapas de filtragem e montagem, obtivemos uma média de 20.206.660 sequências e 62.704,63 *contigs* por amostra (Tabela 12).

Tabela 12: Resultado do sequenciamento das bibliotecas *shotgun* das 19 amostras fecais de bugios de cativo (C) e vida livre (NC).

| Sample – ID | Input read1+ read2 (#reads) | Sickle (Q>30, pb >50) | Output (#reads) | #contigs |
|---------------------------|--|------------------------------------|----------------------------|-----------------|
| C.1.1 | 1239056 | 1133168 | 1108019 | 30482 |
| C.1.2 | 1516456 | 1379262 | 1372433 | 42936 |
| C.1.3 | 925404 | 868538 | 867094 | 31993 |
| C.2.1 | 1042986 | 960612 | 932784 | 34536 |
| C.2.2 | 662706 | 608422 | 605614 | 26114 |
| C.2.3 | 778424 | 720698 | 720590 | 36241 |
| C.3.1 | 1856482 | 1614594 | 1601469 | 49195 |
| C.3.2 | 1920076 | 1723041 | 1722885 | 46405 |
| C.3.4 | 1943090 | 1726546 | 1725956 | 62292 |
| C.4.1 | 1750808 | 1572843 | 1568472 | 69428 |
| C.4.2 | 5735850 | 3494406 | 3490170 | 13678 |
| C.4.4 | 2437024 | 2106891 | 2103264 | 81191 |
| C.4.5 | 2215070 | 2037672 | 2035301 | 54080 |
| NC.1 (1.1+1.2+1.3) | 2863886 | 2742962 | 2740402 | 88369 |
| NC.2 (2.1+2.2) | 4516506 | 4289140 | 4243098 | 150121 |
| NC.3 (3.1+3.2+3.2) | 3499508 | 3307701 | 3297146 | 94735 |
| NC.4.1 (4.1 + 4.2) | 4029456 | 3782572 | 3764236 | 114782 |
| NC.4.3 | 2541706 | 2364030 | 2355563 | 85477 |

| | | | | |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| NC.4.4 | 2528628 | 2347471 | 2252059 | 79333 |
| Total | 44003122 | 38780569 | 38506555 | 1191388 |
| Média | 2315953,79 | 2041082,58 | 2026660,79 | 62704,63 |

3.2.2 Diversidade alfa e beta

Todas as amostras atingiram cobertura suficiente de sequências, indicando que o esforço amostral foi suficiente para cobrir a diversidade bacteriana existente nas duas condições (Figura 11A). Os números de ASVs observadas por amostras estão descritos na tabela 13.

Tabela 13: Número total de ASVs por amostra.

| | Captive | ASVs | Non-captive | ASVs |
|-------------------------|----------------|-------------|--------------------|-------------|
| 1 ^a . Coleta | C.1.1 | 444 | NC.1.1 | 503 |
| | C.1.2 | 498 | NC.1.2 | 634 |
| | C.1.3 | 476 | NC.1.3 | 444 |
| 2 ^a . Coleta | C.2.1 | 675 | NC.2.1 | 234 |
| | C.2.2 | 221 | NC.2.2 | 644 |
| | C.2.3 | 467 | - | - |
| 3 ^a . Coleta | C.3.1 | 968 | NC.3.1 | 725 |
| | C.3.2 | 501 | NC.3.2 | 920 |
| | C.3.4 | 915 | NC.3.3 | 927 |
| 4 ^a . Coleta | C.4.1 | 585 | NC.4.1 | 392 |
| | C.4.2 | 355 | NC.4.2 | 339 |
| | C.4.4 | 485 | NC.4.3 | 775 |
| | C.4.5 | 540 | NC.4.4 | 626 |

A diversidade alfa foi calculada usando o índice de ASVs observadas e de diversidade filogenética (PD) (Faith *et al.*, 2009). Este último soma todos os comprimentos dos ramos como uma medida de diversidade. Portanto, ao identificar uma nova ASV, e ela estiver intimamente relacionada a outra ASV na amostra, haverá um pequeno aumento na diversidade. No entanto, ao identificar uma nova ASV de uma linhagem totalmente diferente de qualquer outra amostra, a métrica fará com que ela contribua para o aumento da diversidade na amostra testada.

A diversidade alfa não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os números de ASVs identificados em amostras de bugios de vida livre e de cativo. Porém, qualitativamente, observamos uma maior riqueza de ASVs no grupo de indivíduos de vida livre (Figura 11B).

Para calcular a diversidade beta, utilizamos três métricas de distância (*Bray-Curtis*, *Unweighted e Weighted UniFrac*) a fim de avaliar a diferença entre as comunidades bacterianas de bugios de cativo e vida livre. Todas as métricas apresentaram resultado consistente e significância estatística ($p = 0,001$) para 999 permutações aplicando os testes PERMANOVA e ANOSIM. A separação destes dois grupos, também foi observada em outros níveis taxonômico, como gênero, família e filo (Figura 11C).

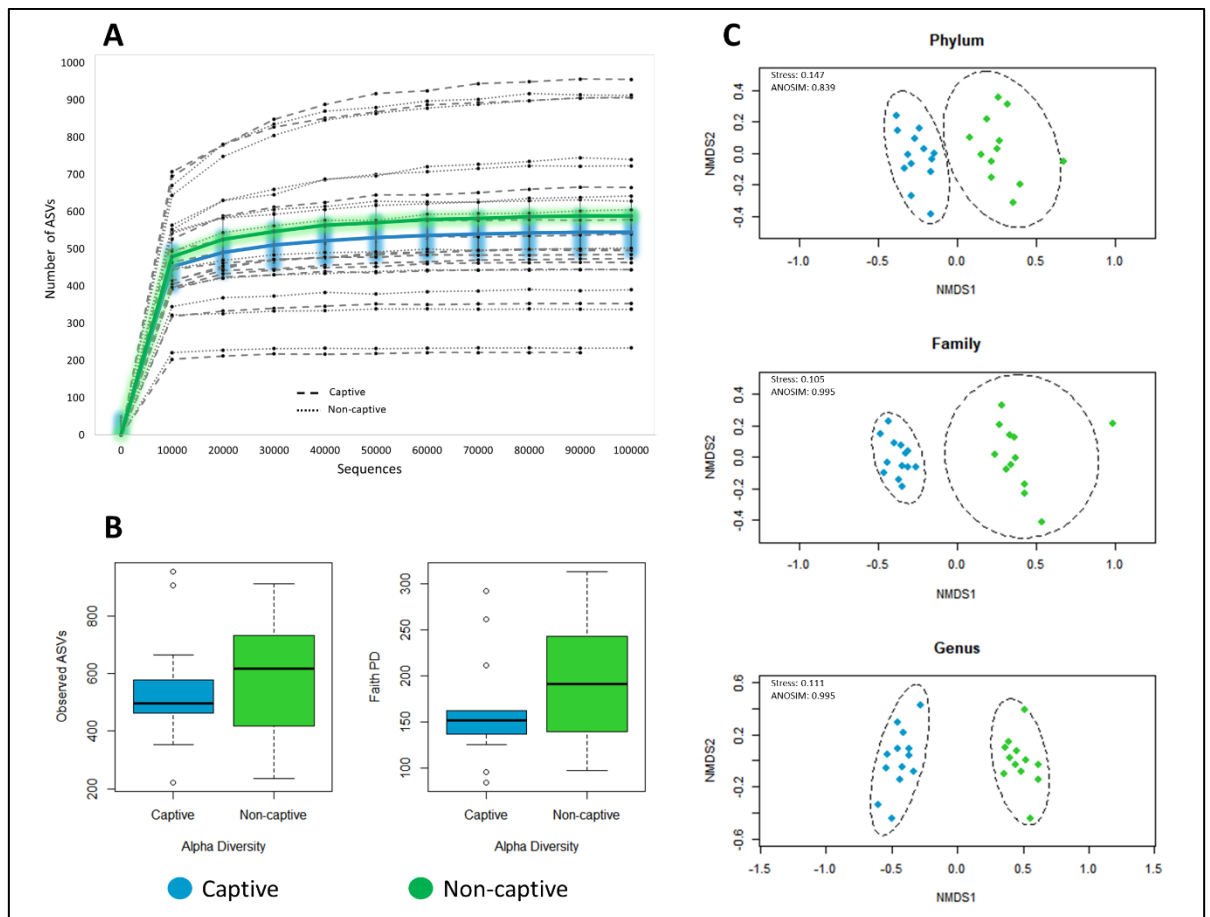


Figura 11: Diversidade alfa e beta para amostras de bugios de cativo e vida livre. (A): Curvas de rarefação indicando o número de ASVs por amostra. Linhas tracejadas e pontilhadas representam amostras de indivíduos de cativo e vida livre, respectivamente. As linhas cheias indicam a média de ASVs observadas para ambos os grupos. Azul: amostras de indivíduos de cativo; verde: amostras de indivíduos de vida livre. **(B):** Boxplots mostrando a diversidade alfa em amostras de bugios de cativo e vida livre usando diferentes métricas (ASVs observados e Distância Filogenética (PD)). **(C):** Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), utilizando a métrica Bray-Curtis, geradas a partir da abundância de ASVs classificadas em diferentes níveis (Filo, Família e Gênero). Pontos em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre. As elipses representam o nível de confiança de 95%, assumindo uma distribuição multivariada.

Também avaliamos, se o fato do nosso grupo amostral possuir fêmeas e machos, bem como duas espécies distintas (*Allouata caraya* e *Allouata guariba clamitans*) poderia influenciar nos resultados de agrupamento. Nossos resultados demonstraram que o sexo e espécie dos macacos bugios, não influenciaram no agrupamento distinto de macacos de cativeiro e de vida livre (Tabela 14).

Tabela 14: Beta diversidade. Testes PERMANOVA e ANOSIM (999 permutações) para métricas de diversidade beta em relação ao hábitat, sexo e espécie.

| | Beta Diversidade | | | | | |
|----------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | Bray-curtis | | Unweighted UniFrac | | Weighted UniFrac | |
| | PERMANOVA (pseudo-F) | ANOSIM (R) | PERMANOVA (pseudo-F) | ANOSIM (R) | PERMANOVA (pseudo-F) | ANOSIM (R) |
| Habitat | 11,25 | 0,99 | 3,99 | 0,86 | 22,93 | 0,97 |
| | p-value=0,001 | p-value=0,001 | p-value=0,001 | p-value=0,001 | p-value=0,001 | p-value=0,001 |
| Sexo | 2,49 | 0,37 | 1,55 | 0,30 | 2,25 | 0,17 |
| | p-value=0,002 | p-value=0,003 | p-value=0,001 | p-value=0,001 | p-value=0,009 | p-value=0,058 |
| Espécie | 3,16 | 0,37 | 1,67 | 0,15 | 3,81 | 0,18 |
| | p-value=0,004 | p-value=0,001 | p-value=0,009 | p-value=0,117 | p-value=0,016 | p-value=0,025 |

3.2.3 Perfil taxonômico

3.2.3.1 Composição da comunidade bacteriana com dados de rRNA16S

A análise de cobertura taxonômica gerada pelo sequenciamento dos *amplicons* obtidos com o par de *primers* S-D-Bact-0341-b-S-17|S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth *et al.*, 2013) mostrou que a amplificação cobriu 82,80%, 0,30% e 0,03% dos domínios Bacteria, Archaea e Eukaryota, respectivamente, presentes no banco de dados SILVA-132 (Quast *et al.*, 2012).

A composição bacteriana varia já no nível de filo (Figura 12D), predominando os filios Firmicutes e Bacteroidetes em ambos os grupos, porém com proporções diferentes. No grupo de cativeiro a abundância de Firmicutes e Bacteroidetes foi de 26,07% e 30%, respectivamente e no grupo de vida livre foi de 39,41% e 37,43%, respectivamente. Destacamos também os filios Spirochaetes e Proteobacteria, mais abundantes em indivíduos cativos, onde estes dois filios somam 30,97% da abundância total do grupo cativo, enquanto os filios Tenericutes, Cyanobacteria e o já citado Firmicutes, são mais abundantes em indivíduos de vida livre, somando 51,39 % da abundância total do grupo de vida livre (Figura 12A).

As famílias Prevotellaceae (33,02%), Ruminococcaceae (14,80%) e Erysipelotrichaceae (5,78%), diferiram significativamente ($p < 0.05$) em relação a abundância relativa, sendo mais abundantes em indivíduos de vida livre, enquanto as famílias Succinibrionaceae (12,66%), Spirochaetaceae (14,80%), são mais abundantes em indivíduos de cativeiro (Figura 12E).

Gêneros representantes destas famílias, também diferiram significativamente em relação a sua abundância relativa: Prevotellaceae UCG-001 (7,81%), Ruminococcaceae UCG-014 (3,94%) e *Faecalibacterium* (3,18%), mais abundantes em indivíduos de vida livre; *Treponema2* (13,88%) e *Succinivibrio* (8,26%), mais abundantes em indivíduos de cativeiro (Figura 12C e 12F). Também destacamos dois gêneros Christensenellaceae R-7 group (0,70%), Parabacteroides (1,67%), das famílias Christensenellaceae e Porphyromonadaceae, respectivamente, significativamente mais abundante em indivíduos de cativeiro (Figura 12F). A análise do perfil taxonômico em nível de gênero, também revelou uma maior quantidade de ASVs não classificadas em indivíduos de vida livre (Figura 12C).

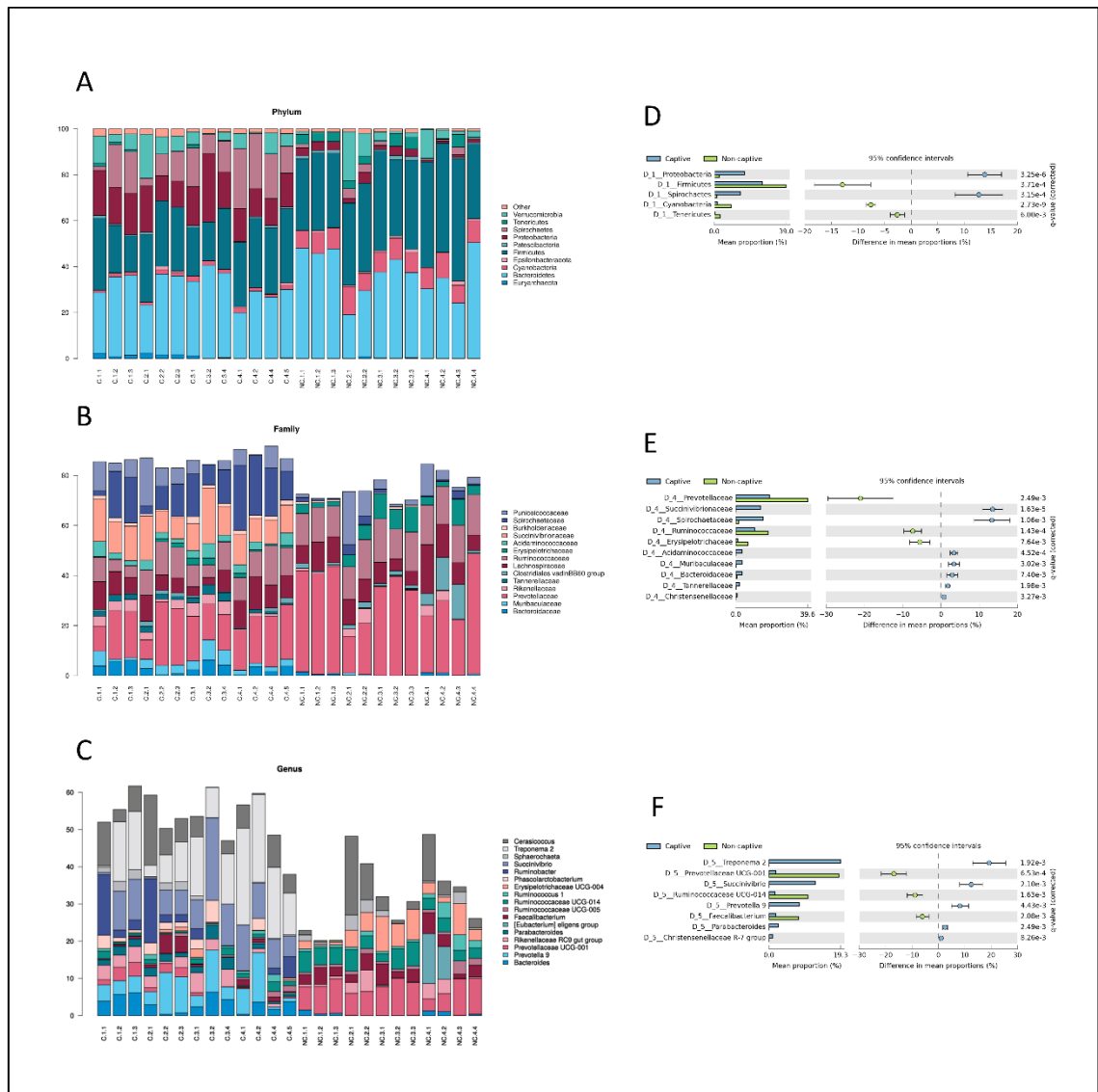


Figura 12: Perfil da comunidade bacteriana. Abundância relativa de ASVs, classificadas a nível de Filo (A), Família (B) e Gênero (C), em B e C somente táxons com abundância >1% em pelo menos um grupo (cativo e não cativo) foram considerados. Análise de abundância diferencial a nível de filo (D), família (E) e gênero (F), utilizando o *software* STAMP para o teste estatístico Welch's t-test, com correção Storey-FDR.

Uma ASV classificada como *Succinivibrio* foi identificada como táxon indicador em todos os indivíduos de cativeiro, sendo que representa 2,01% da abundância total do grupo cativo e não foi encontrada em indivíduos de vida livre. Três ASVs foram identificadas como CORE 90% do grupo cativo: duas classificadas como *Treponema 2* que juntas somam 4,31% da abundância relativa do grupo cativo, e uma classificada como Bacteroides, que representa 0,36%.

Três ASVs classificadas como Firmicutes, Cericococcus e Prevotellaceae UCG-001, foram identificadas como táxons indicadores em todos os indivíduos de vida livre, estas

representam 1,17%, 0,77% e 0,32% da abundância relativa do grupo, respectivamente. Outras dezessete ASVs foram identificadas como CORE 90%: 1 Firmicutes, 2 Cerasiococcus, 1 Prevotellaceae UCG-001, 2 Ruminococcaceae UCG-014, 1 Desulfovibrio, 1 Ruminococcaceae, 1 Clostridiales, 1 Bacteroidales, 1 Sphaerochaeta, 6 Prevotellaceae. Destacamos a presença destas 6 ASVs classificadas como Prevotellaceae, que juntas, somam 18% da abundância relativa do grupo de vida livre.

Não encontramos nenhuma ASV-CORE de todas as 25 amostras (Figura 13). A abundância relativa de todas ASVs-CORE está representada na Figura 14.

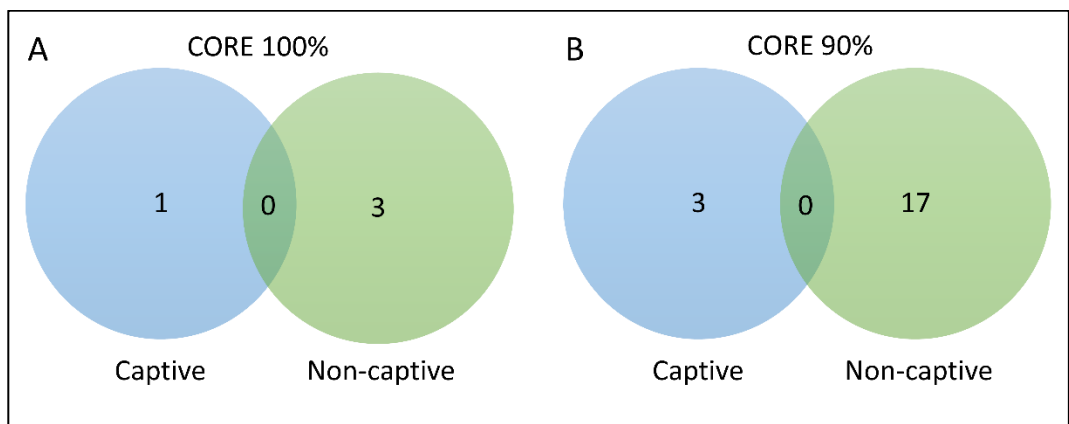


Figura 13: Diagrama de Venn do core-microbiome. (A) CORE utilizando 100%, (B) CORE utilizando 90%, em azul estão representadas ASVs de bugios de cativo e em verde de vida livre.

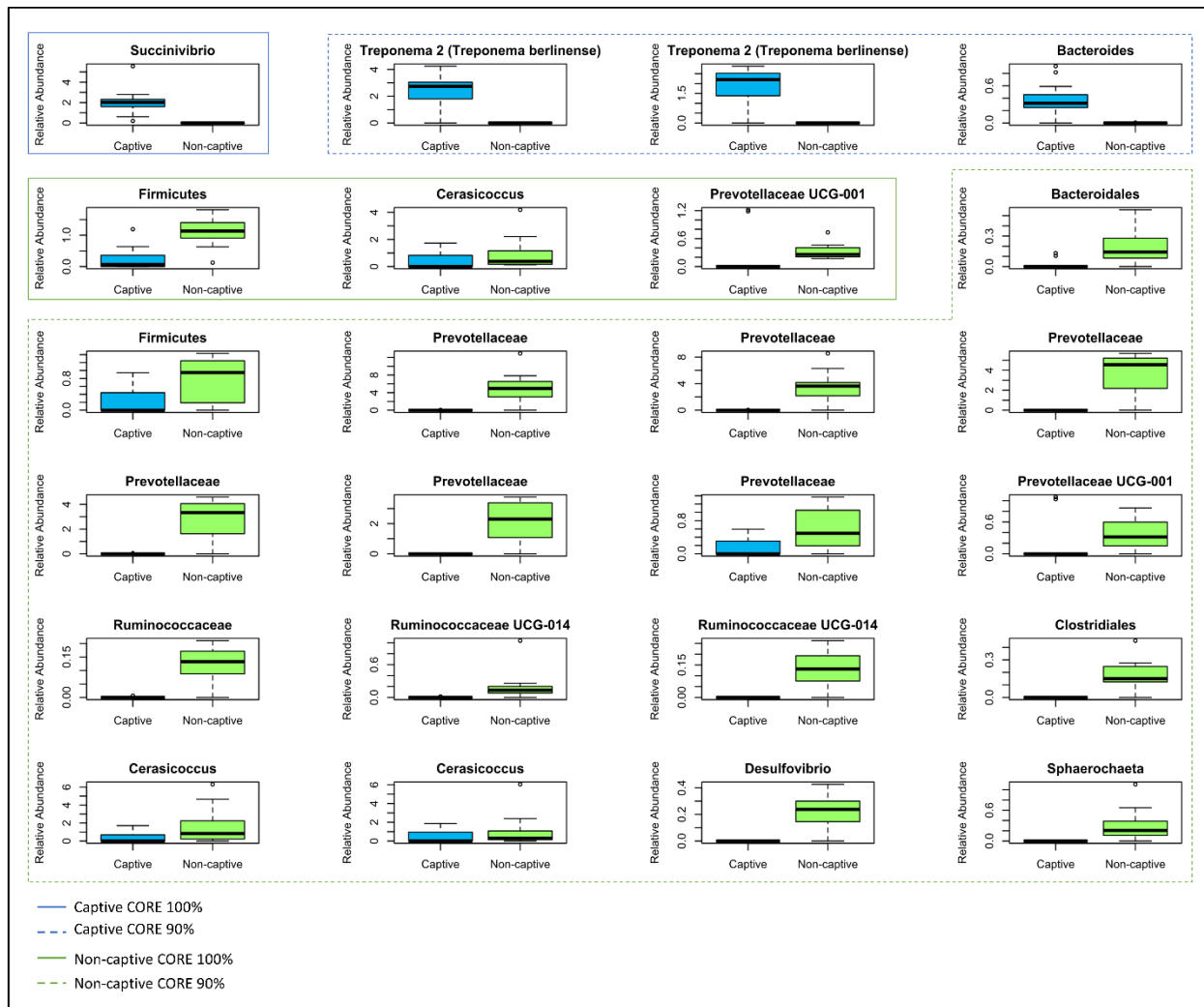


Figura 14: Abundância relativa das ASVs do *core-microbiome*. Box-plot representando as abundâncias relativas das ASVs classificadas como *core* do grupo cativo (azul) e não-cativo (verde). As linhas tracejadas representam o CORE 90% e linhas cheias representam CORE 100%.

3.2.3.2 Análise de seqüências *shotgun*

Para a classificação no nível de espécie bacteriana, utilizamos o *software* Kraken2, o que possibilitou a classificação de 17% dos *reads*. Também foi utilizado o *software* CCMetagen para a classificação de seqüências oriundas de organismos eucariotos, seguindo a metodologia descrita no item 3.1.4.3.

Os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* aparecem com maior abundância nos dois grupos de macacos, mas com proporções contrárias. Observamos uma maior abundância de *Bacteroides* em indivíduos de cativeiro, enquanto *Prevotella* se encontra em maior proporção em indivíduos de vida livre. Destacamos também, os gêneros *Treponema*, *Eubacterium* e

Faecalibacterium, o primeiro mais abundante em cativeiro, enquanto os dois seguintes foram encontrados em maior abundância em indivíduos de vida livre (Figura 15).

Também foi possível identificar um grande número de espécies destes cinco gêneros mais abundantes: 8 espécies do gênero *Bacteroides* (*B. dorei*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. cellulosilyticus*, *B. caccae* e *B. salanitronis*); 6 espécies de *Prevotella* (*P. ruminicola*, *P. intermedia*, *P. dentalis*, *P. denticola*, *P. enoeca* e *P. fusca*); enquanto *Treponema*, *Faecalibacterium* e *Eubacterium* são representados por uma espécie cada, *T. succinifaciens*, *F. prausnitzii* e *E. elegans*, respectivamente.

As poucas sequências provenientes de organismos eucariotos foram majoritariamente classificadas em diferentes plantas e possíveis patógenos eucariotos. Nos indivíduos de vida livre, observamos uma variedade de sequências provenientes de diferentes plantas. A mais encontrada com 309,48 RPM (*reads per million*) foi da espécie *Ficus luschnathiana*, fruto mais comum na alimentação do grupo de bugios de vida livre. Nos indivíduos de cativeiro, foi observado uma única espécie de planta do gênero *Cichorium*, podendo pertencer a espécie *C. intybus* (Catalonha) que é muito comum na dieta dos macacos de cativeiro. Outro gênero que também é comum na dieta dos cativos é o *Gryllus*, utilizado pelo setor PECA (Programa de Enriquecimento Comportamental Animal) da FPZSP para desenvolver atividades direcionadas para o bem-estar animal. Além destes gêneros, observamos também espécies comumente associadas a doenças gastrointestinais como por exemplo o fungo *Enterocytozoon bieneusi* e o nematódeo *Necator americanus*.

Tabela 15: Classificação taxonômica de sequências provenientes de organismos eucariotos. Estão listados os 12 gêneros identificados pelo *software* CCMetagen. RPM: *Reads per million*

| | | Cativeiro (RPM) | Vida Livre (RPM) |
|---------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
| Fungi | <i>Enterocytozoon bieneusi</i> | 3,2 | 0 |
| | <i>Gryllus</i> | 12,08 | 0 |
| Metazoa | <i>Alouatta guariba</i> | 0 | 7,17 |
| | <i>Syphacia</i> | 21,72 | 0 |
| | <i>Necator americanus</i> | 9,41 | 0 |
| | <i>Cichorium</i> | 17,24 | 0 |
| Viridiplantae | <i>Staphylea</i> | 0 | 3,33 |
| | <i>Ceiba speciosa</i> | 0 | 26,24 |
| | <i>Gossypium</i> | 0 | 8,2 |
| | <i>Ochroma pyramidale</i> | 0 | 11,06 |
| | <i>Ficus luschnathiana</i> | 0 | 309,48 |
| | <i>Ziziphus</i> | 0 | 16,63 |

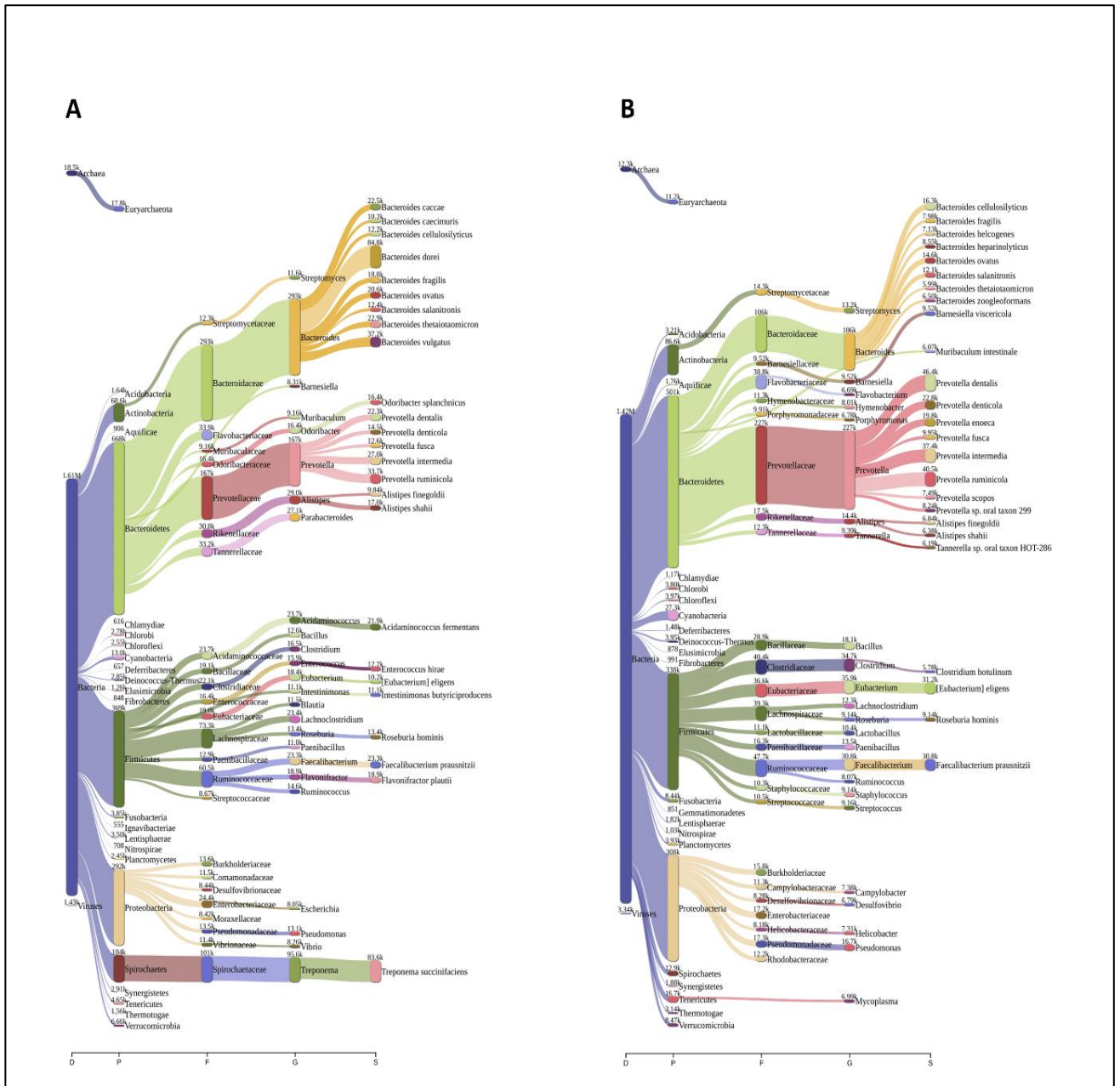


Figura 15: Classificação taxonômica dos reads de *shotgun* com software Kraken2. Estão listadas as 25 espécies mais abundantes identificadas em (A) bugios de cativeiro e (B) bugios de vida livre, o número representa a quantidade de *reads* classificadas em cada táxon. No eixo x estão representadas 5 categorias taxonômicas: D: Domínio, P: Filo, F: Família, G: Gênero e S: Espécie.

3.2.3.3 Identificação taxonômica e abundância relativa de MAGs

Após o processo de montagem das reads do sequenciamento *shotgun*, foi realizada a recuperação de genomas bacterianos (MAGs) como descrito no item 3.1.4.2 Após a utilização

de três ferramentas de *binning* (Concoct, Maxbin2 e Metabat2), utilizamos o *software* *Metawrap* para refinar o *binning* e filtramos os MAGs bacterianos com completude >85% e contaminação <5% (Figura 19). O total obtido foi de 58 MAGs, sendo 22 MAGs provenientes de amostras de cativeiro (BIN01-BIN22) e 36 MAGs provenientes de amostras de vida livre (BIN23-BIN58). Destacamos também, que 40 destes genomas tiveram completude >90% e 42 genomas tiveram contaminação <2% (tabela 16).

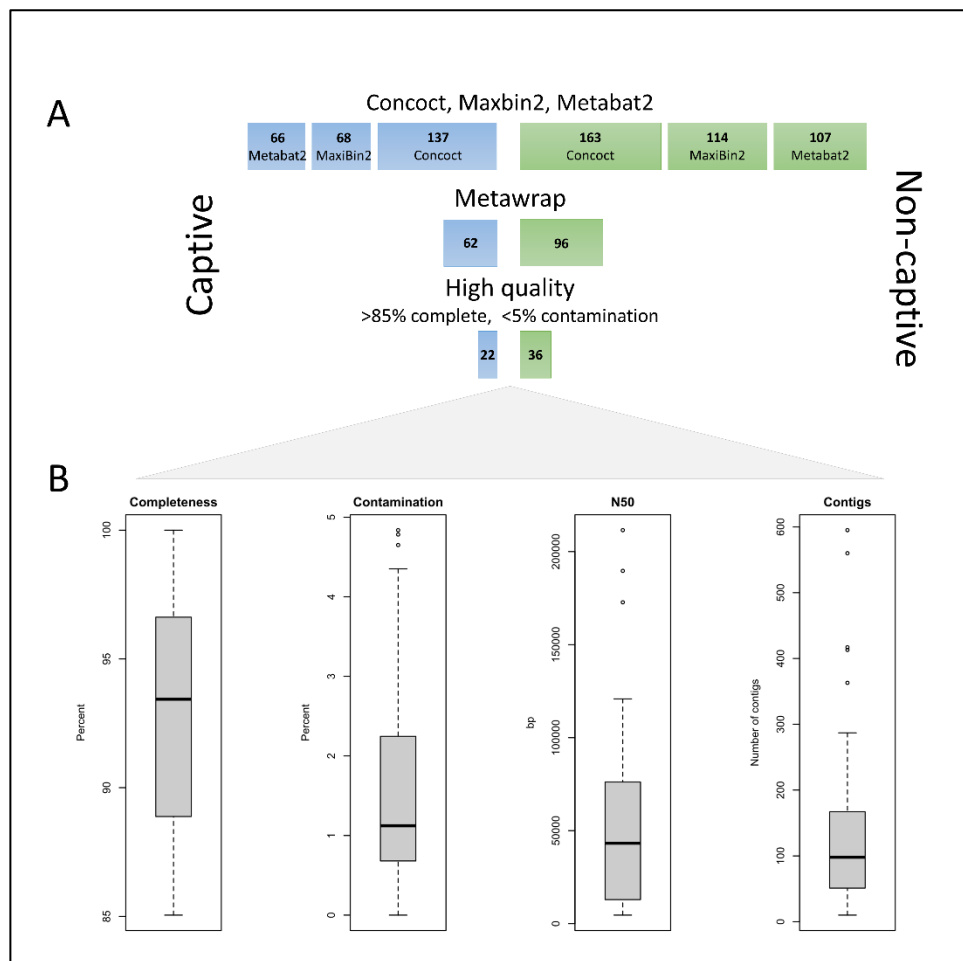


Figura 19. Recuperação de genomas bacterianos. **A:** Etapas de *binning* dos contigs de amostras provenientes de indivíduos de cativeiro (azul) e vida livre (verde). **B:** Distribuição da % de completude, % de contaminação, N50 e número de *contigs* dos 58 MAGs com alta qualidade.

Tabela 16: Métricas dos 58 MAGs recuperados

| ID | Completo (%) | Contaminação (%) | Cobertura Média | GC (%) | N50 (pb) | Size (pb) |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| BIN_01 | 87,72 | 4,782 | 17x | 0,426 | 19657 | 3332793 |
| BIN_02 | 97,33 | 1,069 | 29x | 0,463 | 47693 | 2957232 |
| BIN_03 | 87,81 | 2,270 | 69x | 0,511 | 7475 | 2558386 |
| BIN_04 | 99,30 | 0,749 | 24x | 0,405 | 120851 | 2832705 |
| BIN_05 | 92,87 | 2,944 | 18x | 0,418 | 13598 | 2568268 |
| BIN_06 | 98,14 | 0,000 | 12x | 0,478 | 64875 | 3375432 |
| BIN_07 | 91,89 | 1,666 | 80x | 0,365 | 12926 | 2288329 |
| BIN_08 | 94,38 | 0,000 | 54x | 0,455 | 8013 | 1613668 |
| BIN_09 | 88,46 | 3,162 | 19x | 0,353 | 16574 | 1871130 |
| BIN_10 | 95,96 | 0,832 | 48x | 0,473 | 108148 | 1664374 |
| BIN_11 | 95,07 | 1,428 | 13x | 0,509 | 70808 | 3643759 |
| BIN_12 | 99,61 | 0,370 | 20x | 0,463 | 100605 | 3167817 |
| BIN_13 | 97,63 | 2,086 | 12x | 0,434 | 24300 | 2901174 |
| BIN_14 | 86,57 | 4,837 | 43x | 0,424 | 9007 | 2886310 |
| BIN_15 | 90,04 | 1,925 | 59x | 0,394 | 5230 | 2184535 |
| BIN_16 | 88,77 | 1,351 | 10x | 0,504 | 8150 | 1742070 |
| BIN_17 | 100 | 0,064 | 10x | 0,402 | 26789 | 2623820 |
| BIN_18 | 93,63 | 1,073 | 21x | 0,533 | 22455 | 2475919 |
| BIN_19 | 96,14 | 1,458 | 34x | 0,533 | 19097 | 1594819 |
| BIN_20 | 87,56 | 0,932 | 25x | 0,394 | 7956 | 2342315 |
| BIN_21 | 99,25 | 1,111 | 11x | 0,455 | 83033 | 3256891 |
| BIN_22 | 95,33 | 0,920 | 14x | 0,481 | 13206 | 2434161 |
| BIN_23 | 98,51 | 0,555 | 242x | 0,486 | 69131 | 2907224 |
| BIN_24 | 95,56 | 0,832 | 32x | 0,471 | 81732 | 1768546 |
| BIN_25 | 92,13 | 2,247 | 47x | 0,259 | 32885 | 1506483 |
| BIN_26 | 85,05 | 1,428 | 19x | 0,539 | 6947 | 2223578 |
| BIN_27 | 89,86 | 0,765 | 11x | 0,522 | 8682 | 1535132 |
| BIN_28 | 96,62 | 1,123 | 43x | 0,524 | 189664 | 1277535 |
| BIN_29 | 91,19 | 3,333 | 22x | 0,509 | 25269 | 1953054 |
| BIN_30 | 88,60 | 0,280 | 15x | 0,309 | 9980 | 932638 |
| BIN_31 | 92,08 | 4,351 | 50x | 0,550 | 29036 | 2371038 |
| BIN_32 | 88,88 | 0,854 | 29x | 0,377 | 72845 | 2042004 |
| BIN_33 | 92,93 | 3,866 | 28x | 0,488 | 62269 | 2156022 |
| BIN_34 | 96,62 | 1,123 | 11x | 0,274 | 76147 | 1626106 |
| BIN_35 | 95,34 | 2,247 | 9x | 0,374 | 57505 | 1130371 |
| BIN_36 | 93,16 | 1,843 | 46x | 0,516 | 46205 | 2445833 |
| BIN_37 | 95,50 | 1,685 | 37x | 0,263 | 172753 | 1273185 |
| BIN_38 | 86,74 | 3,981 | 7x | 0,494 | 24962 | 2217556 |
| BIN_39 | 88,03 | 0,854 | 38x | 0,363 | 97155 | 2213882 |

| | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-----|-------|--------|---------|
| BIN_40 | 95,71 | 0,476 | 32x | 0,576 | 87962 | 2028515 |
| BIN_41 | 96,37 | 0,000 | 31x | 0,466 | 52236 | 1980828 |
| BIN_42 | 91,06 | 0,681 | 13x | 0,551 | 9504 | 2232583 |
| BIN_43 | 88,88 | 0,000 | 29x | 0,356 | 104010 | 2198282 |
| BIN_44 | 95,56 | 0,000 | 29x | 0,454 | 45720 | 1866447 |
| BIN_45 | 97,02 | 3,035 | 25x | 0,477 | 50982 | 3023267 |
| BIN_46 | 93,24 | 0,675 | 36x | 0,505 | 88194 | 1988735 |
| BIN_47 | 97,37 | 1,342 | 22x | 0,371 | 49227 | 2751940 |
| BIN_48 | 96,63 | 0,925 | 26x | 0,519 | 44799 | 2903968 |
| BIN_49 | 98,87 | 1,123 | 20X | 0,476 | 211542 | 1769599 |
| BIN_50 | 89,68 | 1,173 | 30x | 0,503 | 12629 | 1419626 |
| BIN_51 | 88,13 | 4,650 | 26x | 0,500 | 25263 | 2466140 |
| BIN_52 | 88,75 | 3,430 | 79x | 0,501 | 4580 | 2255551 |
| BIN_53 | 98,53 | 0,000 | 10x | 0,491 | 85923 | 2050565 |
| BIN_54 | 85,41 | 3,225 | 72x | 0,490 | 6621 | 1508244 |
| BIN_55 | 90,97 | 0,370 | 22x | 0,508 | 41640 | 2378802 |
| BIN_56 | 98,86 | 0,000 | 8x | 0,510 | 95088 | 2324635 |
| BIN_57 | 89,78 | 1,612 | 26x | 0,435 | 10275 | 2078256 |
| BIN_58 | 95,91 | 1,394 | 8x | 0,499 | 72653 | 2263290 |

A classificação taxonômica dos 58 MAGs foi realizada utilizando-se dois parâmetros: ANI com 95% de identidade e $AF > 65\%$; e posicionamento em árvore filogenética (*Placement*), utilizando 120 marcadores filogenéticos. Dos 58 genomas, 7 foram classificados utilizando ambos os critérios, todos provenientes de amostras de bugios de cativeiro. A grande maioria, 51 genomas, foi classificada utilizando o critério de posicionamento na árvore filogenética, destes, 25 tiveram sua classificação taxonômica definida pela topologia da árvore; e 26 foram classificados como possíveis novidades taxonômicas (tabela 17), indicando que a divergência evolutiva relativa (RED) e a colocação do genoma na árvore de referência, não foram suficientes para determinar níveis taxonômicos mais baixos.

As Ordens RfN20 (n=6) e RF32 (n=2) foram encontradas somente em amostras de indivíduos de vida livre, enquanto Enterobacterales (n=2) e Treponematales (n=3) foram exclusivos de Cativeiro. A grande maioria dos MAGs são da ordem Bacteroidales (n=23) (Figura 16).

Tabela 17: Classificação taxonômica dos 58 MAGs.

| ID | Classificação | Valor ANI | Valor AF | Método de classificação | Valor RED |
|--------|--|-----------|----------|-------------------------|-----------|
| BIN_01 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__CAG-95 | 78.25 | 0.25 | Placement* | 0.95 |
| BIN_02 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 80.31 | 0.07 | Placement* | 0.96 |
| BIN_03 | p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Opitutales;f__UBA953 | N/A | N/A | Placement** | 0.75 |
| BIN_04 | p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Succinivibrionaceae;g__Ruminobacter | 78.86 | 0.1 | Placement* | 0.95 |
| BIN_05 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotellamassilia | 77.22 | 0.15 | Placement* | 0.97 |
| BIN_06 | p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Betaproteobacteriales;f__Burkholderiaceae | N/A | N/A | Placement* | 0.90 |
| BIN_07 | p__Spirochaetota;c__Spirochaetia;o__Treponematales;f__Treponemataceae;g__Treponema_D;s__Treponema_D berlinense | 97.98 | 0.89 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_08 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella;s__Prevotella sp20 | 97.5 | 0.8 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_09 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 78.23 | 0.31 | Placement* | 0.97 |
| BIN_10 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella;s__Prevotella sp13 | 97.69 | 0.73 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_11 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 77.16 | 0.12 | Placement* | 0.96 |
| BIN_12 | p__Spirochaetota;c__Spirochaetia;o__Treponematales;f__Treponemataceae;g__Treponema_D | 77.52 | 0.16 | Placement* | 0.94 |
| BIN_13 | p__Spirochaetota;c__Spirochaetia;o__Sphaerochaetales;f__Sphaerochaetaceae;g__Spiro-01 | N/A | N/A | Placement** | 0.89 |
| BIN_14 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 80.63 | 0.16 | Placement* | 0.96 |
| BIN_15 | p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Succinivibrionaceae;g__Succinivibrio;s__GCA_000431835.1 | 97.93 | 0.85 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_16 | p__Elusimicrobiota;c__Elusimicrobia;o__Elusimicrobiales;f__Elusimicrobiaceae | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_17 | p__Cyanobacteriota;c__Vampirovibrionia;o__Gastranaerophilales;f__Gastranaerophilaceae;g__Zag111 | 78.79 | 0.38 | Placement* | 0.95 |
| BIN_18 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |

| | | | | | |
|---------------|--|-------|------|---------------|------|
| BIN_19 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__UBA932;g__RC9;s__GCA_000433355.1 | 96.93 | 0.69 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_20 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella; s__GCA_000436915.1 | 97.09 | 0.78 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_21 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__CAG-590 | 78.62 | 0.17 | Placement** | 0.94 |
| BIN_22 | p__Spirochaetota;c__Spirochaetia;o__Treponematales;f__Treponemataceae;g__Treponema_D; s__Treponema_D succinifaciens | 98.13 | 0.89 | ANI/Placement | N/A |
| BIN_23 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 77.48 | 0.12 | Placement* | 0.95 |
| BIN_24 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-288;g__CAG-568 | N/A | N/A | Placement** | 0.88 |
| BIN_25 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 77.35 | 0.17 | Placement* | 0.97 |
| BIN_26 | p__Firmicutes_C;c__Negativicutes;o__Acidaminococcales;f__Acidaminococcaceae | N/A | N/A | Placement** | 0.82 |
| BIN_27 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_28 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 77.65 | 0.16 | Placement* | 0.96 |
| BIN_29 | p__Spirochaetota;c__Spirochaetia;o__Sphaerochaetales;f__Sphaerochaetaceae;g__Spiro-01 | N/A | N/A | Placement** | 0.87 |
| BIN_30 | p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32;f__CAG-239 | N/A | N/A | Placement** | 0.84 |
| BIN_31 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotellamassilia | N/A | N/A | Placement** | 0.96 |
| BIN_32 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_33 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RF39;f__UBA660;g__CAG-605 | 78.11 | 0.33 | Placement* | 0.96 |
| BIN_34 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__UBA932;g__RC9 | 77.58 | 0.2 | Placement* | 0.98 |
| BIN_35 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_36 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-826 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_37 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__UBA932;g__RC9 | 78.4 | 0.11 | Placement* | 0.98 |
| BIN_38 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-288;g__CAG-568 | N/A | N/A | Placement** | 0.93 |
| BIN_39 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 76.77 | 0.1 | Placement* | 0.96 |
| BIN_40 | p__Cyanobacteriota;c__Vampirovibrionia;o__Gastranaerophilales;f__Gastranaerophilaceae; g__Zag111 | 77.25 | 0.21 | Placement* | 0.95 |

| | | | | | |
|---------------|--|-------|------|-------------|------|
| BIN_41 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__43-108 | N/A | N/A | Placement** | 0.93 |
| BIN_42 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-826 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_43 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotellamassilia | 77.85 | 0.13 | Placement* | 0.97 |
| BIN_44 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-826 | N/A | N/A | Placement** | 0.80 |
| BIN_45 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 76.73 | 0.1 | Placement* | 0.96 |
| BIN_46 | p__Cyanobacteriota;c__Vampirovibrionia;o__Gastranaerophilales;f__Gastranaerophilaceae; g__Zag111 | 78.59 | 0.41 | Placement* | 0.96 |
| BIN_47 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__UBA932;g__RC9 | 77.09 | 0.1 | Placement* | 0.95 |
| BIN_48 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_49 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__F0040 | N/A | N/A | Placement** | 0.95 |
| BIN_50 | p__Cyanobacteriota;c__Vampirovibrionia;o__Gastranaerophilales;f__Gastranaerophilaceae; g__UBA2883 | 77.29 | 0.24 | Placement** | 0.94 |
| BIN_51 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__4C28d-15;f__CAG-727 | N/A | N/A | Placement** | 0.81 |
| BIN_52 | p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Opitutales;f__UBA953 | N/A | N/A | Placement** | 0.75 |
| BIN_53 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae; g__Lachnospira | 86.45 | 0.67 | Placement* | 0.99 |
| BIN_54 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 76.97 | 0.11 | Placement* | 0.95 |
| BIN_55 | p__Firmicutes;c__Bacilli;o__RFN20;f__CAG-449;g__CAG-449 | N/A | N/A | Placement** | 0.86 |
| BIN_56 | p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32;f__CAG-239;g__51-20 | 78.79 | 0.45 | Placement** | 0.92 |
| BIN_57 | p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella | 77.44 | 0.15 | Placement* | 0.97 |
| BIN_58 | p__Firmicutes_A;c__Clostridia;o__CAG-41 | N/A | N/A | Placement** | 0.62 |

* Classificação taxonômica definida pela topologia da árvore.

** Novidade taxonômica

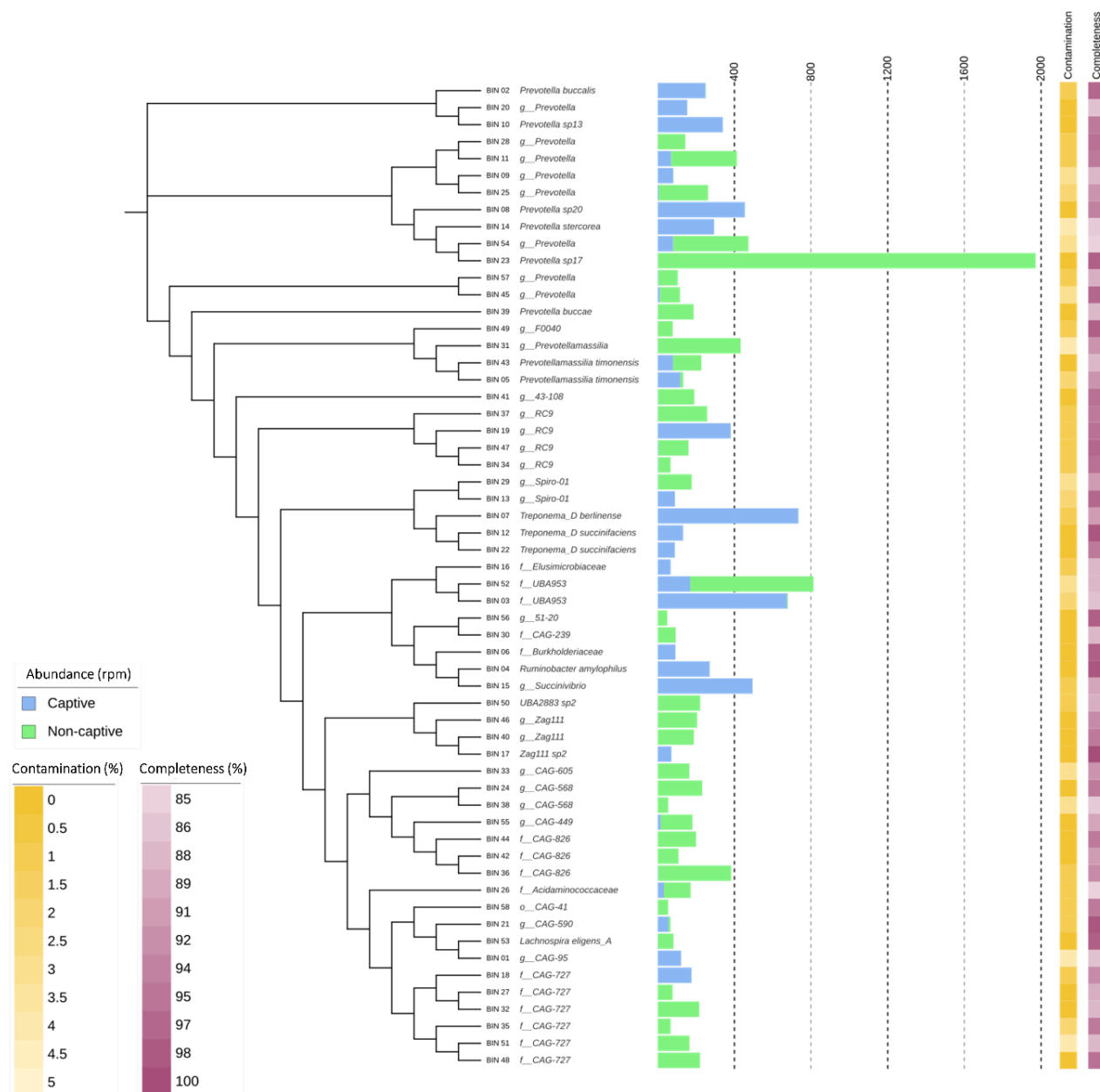


Figura 16: Árvore filogenética dos 58 MAGs recuperados. Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de 120 genes marcadores bacterianos (Parks *et al.*, 2015) (Parks *et al.*, 2018) usados para inferência filogenética. As barras na horizontal representam a abundância em RPM de cada MAG em amostras de cativo (azul) e vida livre (verde). Os *heatmaps*, amarelo e roxo, representam a porcentagem de contaminação e completude de cada MAG, respectivamente.

3.2.4 Análise funcional de metagenomas *shotgun* e de MAGs

As análises funcionais dos MAGs, utilizando a base de dados do COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*), evidenciaram a separação de amostras de bugios de

cativos e vida livre (Figura 17A). As análises do COG demonstraram o enriquecimento de genes da classe X (genes envolvidos na categoria de fagos, profagos, elementos de transposição e plasmídeos) e L (Replicação, recombinação e reparo) estão enriquecidos em indivíduos de vida livre. Em indivíduos de cativo, todas as classes relacionadas ao metabolismo (C, E, F, G, H, I, P e Q) foram encontradas em maior abundância quando comparado a indivíduos de vida livre (Figura 17B).

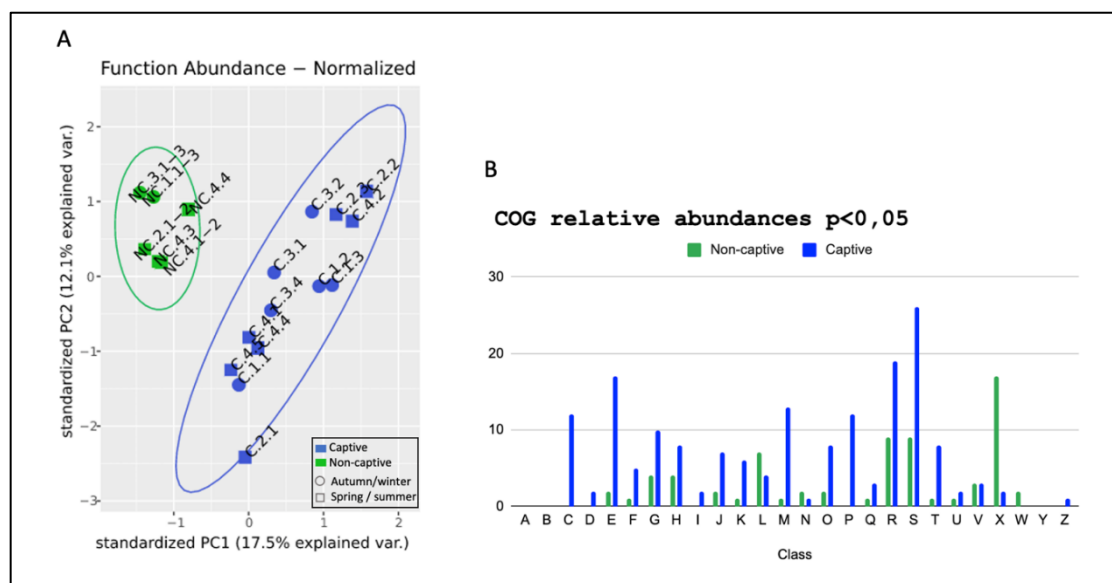


Figura 17: Perfil funcional baseada na anotação COG. A: Análise de Componentes Principais (PCA) geradas a partir da anotação de COGs baseada nos *contigs* após normalização. Pontos em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre; os círculos representam amostras coletadas no outono/inverno e o quadrado na primavera/verão. As elipses representam o nível de confiança de 95%, assumindo uma distribuição multivariada. **B:** Contagem de Classificação funcional dos genes COG, são mostradas apenas as contagens de genes que tiveram significância estatística ($p < 0,05$). As categorias COG são as seguintes: processamento e modificação de RNA (A); dinâmica e estrutura de cromatina (B); produção e conversão de energia (C); partição cromossômica (D); transporte e metabolismo de aminoácidos (E); divisão celular, transporte e metabolismo de nucleotídeos (F); transporte e metabolismo de carboidratos (G); transporte e metabolismo de coenzimas (H); transporte e metabolismo lipídico (I); tradução e biogênese (J); transcrição (K); replicação, recombinação e reparo (L); parede celular/membrana/envelope (M); motilidade celular (N); renovação de proteínas, chaperonas (O); transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P); metabolismo secundário (Q); somente predição de função geral (R); função desconhecida (S); mecanismos de transdução de sinal (T); tráfico e secreção intracelular (U); mecanismos de defesa (V); genes envolvidos na categoria de fagos, profagos, elementos de transposição e plasmídeos (X); estrutura extracelular; (W); estrutura nuclear (Y); citoesqueleto (Z). Barras em azul representam amostras de indivíduos de Cativo e em verde de Vida Livre.

Comparamos a presença de genes das vias de produção de três importantes ácidos graxos de cadeia curta (SCAFs): butirato, propanato e acetato nos *contigs*, mas não encontramos diferença significativa ($p > 0,05$) no potencial genético de produção de SCFA's pela microbiota de macacos de cativo e vida livre. Para detalhar e aprofundar

as análises funcionais, avaliamos o potencial de produção de SCAFs e a capacidade de degradação de biomassa nos 58 MAGs recuperados. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

3.2.4.1 Enriquecimento de enzimas hidrolíticas e vias de produção de ácidos graxos de cadeias curtas (SCFAs) em MAGs

Observamos que a abundância de CAZymes relacionadas a degradação de celulose, amido e pectina variam de acordo com o perfil taxonômico dos MAGs (Figura 18).

A hidrólise de celulose envolve principalmente enzimas pertencentes a subfamílias GH5, GH8, GH9, GH44, GH48. Observamos que estas enzimas estão mais presentes em genomas da família Bacteroidaceae, independente do grupo cativo ou não cativo (Figura 18A).

A hidrólise de amido envolve principalmente enzimas pertencentes a subfamília GH13 relacionadas a α -amylase, além desta subfamília, outras GHs também estão envolvidas na degradação de amido: GH4, GH13, GH63, GH97 relacionados a α -glucosidase. A anotação para estes grupos mostrou que estas enzimas estão mais presentes em genomas da família Bacteroidaceae GH97 (Figura 18B).

A hidrólise de pectina envolve principalmente enzimas pertencentes a subfamílias de GH28, PL9, PL1, CE8 e CE12. Observamos que estas enzimas estão mais presentes em genomas da família Bacteroidacea (Figura 18C)

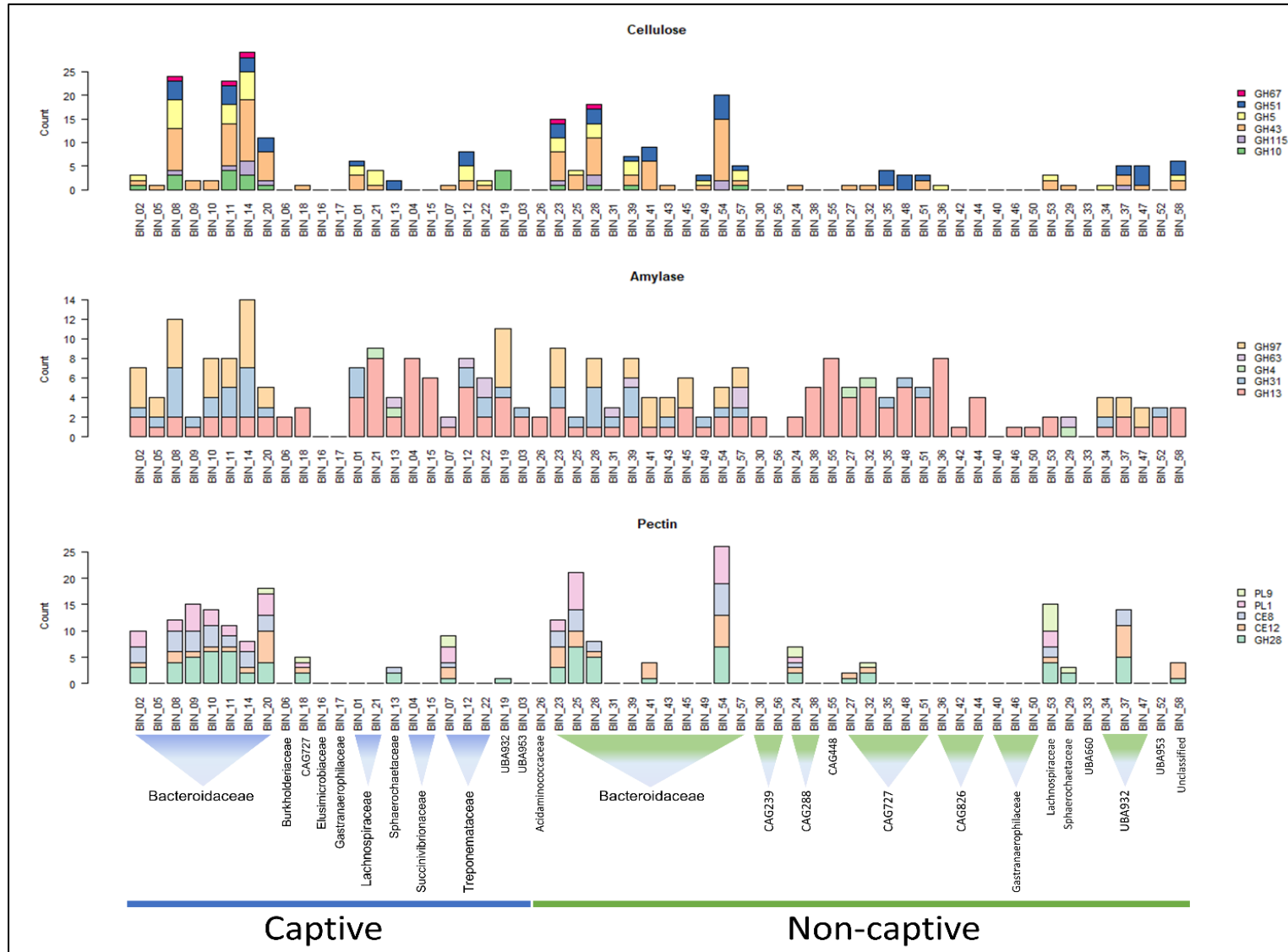


Figura 18: Perfil de CAZymes dos 58 MAGs. Distribuição das famílias CAZy relacionadas a degradação de celulose (A), Amilase (B) e Pectinase (C). No eixo X estão os 58 MAGs agrupados por condição: cativo (azul) e vida livre (verde) e sub-agrupados por família. O eixo Y apresenta a contagem de cada família CAZy de interesse.

Selecionamos conjuntos de genes relacionados a síntese de butirato (EC:1.1.1.157, EC:1.3.8.1, EC:2.3.1.19, EC:3.2.1.9, EC:2.7.2.7, EC:4.2.1.17), propanato (EC:2.8.3.1) e acetato (EC:2.3.1.8, EC:2.7.2.1). Genes da enzima propianate-CoA-transferase (EC:2.8.3.1) não foram encontrados em nenhum MAG. Em contrapartida, pelo menos uma enzima relacionada a produção de acetato foi encontrada em todos os MAGs, com exceção do BIN_06, BIN_13, BIN_17 e BIN_50. Destacamos o MAG BIN_21 que apresentou todas as enzimas selecionadas para esta busca e que são relacionadas a síntese de acetato e a síntese de butirato, com exceção da enzima EC:2.3.1.19. O único MAGs que apresentou todas as enzimas exploradas, foi o BIN_01. Estes dois MAGs são oriundos de bugios de cativeiro e ambos da família Lachnospiraceae.

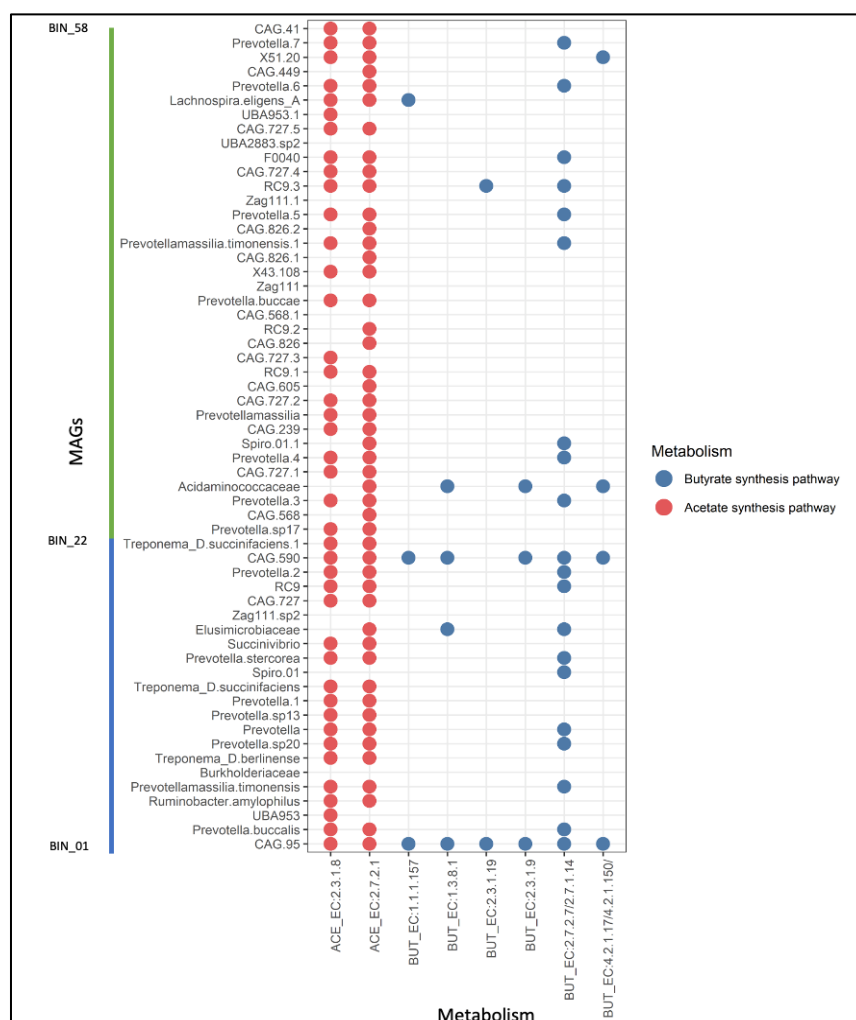


Figura 19: Análise comparativa das enzimas relacionadas a produção de acetato e butirato dos 58 MAGs. No eixo y estão as identificações dos MAGs e no eixo x as enzimas analisadas. A linha na lateral esquerda indica a origem dos MAGs, em azul (BIN_01 a BIN_22) MAGs de bugios de cativeiro e em verde (BIN_23 a BIN_58) MAGs de bugios de vida livre.

3.2.5 Busca por genes de resistência a antibióticos

A busca por genes de resistência a antibióticos (ARGs) em *contigs* revelou que as amostras de indivíduos de cativeiro possuem maior número de genes relacionados a resistência, destacando a classe da Tetraciclina. Amostras de bugios de vida livre também apresentaram genes de resistência em menor quantidade, destacamos as classes de antibióticos Fluoroquinolona e Cefalosporina encontradas em maior número quando comparado a bugios de cativeiro.

Buscamos também genes de resistência nos MAGs. dos 58, apenas cinco carregam genes de resistência (Tabela 18), sendo 3 MAGs provenientes de bugios de cativeiro (BIN_07, BIN_16 e BIN_17). Destacamos a presença da espécie *Treponema berlinense* que carrega o gene Erm(35) e outros 2 MAGs de bugios de vida livre (BIN_40 e BIN_46), ambos contendo o gene *adeF* (bomba de efluxo).

Tabela 18: Genes de resistência encontrados em 5 MAGs de bugios de cativeiro e vida livre.

| ID | Taxon | Drug Class | ARO | Resistance Mechanism |
|--------|-----------------------------|--|---------|------------------------------|
| BIN_07 | <i>Treponema berlinense</i> | macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic | Erm(35) | antibiotic target alteration |
| BIN_16 | Elusimicrobiaceae | fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic | adeF | antibiotic efflux |
| BIN_17 | Zag_111 | fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic | adeF | antibiotic efflux |
| BIN_40 | Zag_111 | fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic | adeF | antibiotic efflux |
| BIN_46 | Zag_111 | fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic | adeF | antibiotic efflux |

3.3 Discussão

3.3.1 Diversidade e composição microbiana

Nossos resultados indicaram uma clara separação entre as amostras de indivíduos de cativeiro e vida livre. Notamos que a composição da microbiota fecal desses animais difere já no nível de filo e essa diferença aumenta conforme descemos no nível taxonômico. Embora a dieta dos macacos de vida livre varie sazonalmente, este estudo

indica que a condição vida livre e cativo influencia majoritariamente na composição e diversidade do microbioma fecal. Notamos também, que os indivíduos de vida livre possuem a diversidade alfa (FaithPD) relativamente maior quando comparamos com indivíduos de cativo. Estas observações corroboram trabalhos já descritos que compararam bugios do gênero *A. pigra* de cativo e vida livre e sugerem que essa diferença na diversidade do microbioma intestinal seja capaz de influenciar a estabilidade da comunidade microbiana, podendo afetar a saúde dos macacos bugios (Amato *et al.*, 2013).

Em ambos os grupos, os filos mais abundantes são Bacteroidetes e Firmicutes, corroborando estudos que mostraram que a composição do microbioma fecal de mamíferos é composto majoritariamente de Bacteroidetes e Firmicutes (Qin *et al.*, 2010; Magne *et al.*, 2020). Estimamos que a relação Firmicutes/Bacteroidetes é de 0,86 para o grupo de cativo e 1,05 para o grupo de vida livre. Em indivíduos de cativo dois outros filos se destacaram quando comparado aos indivíduos de vida livre, Proteobacteria e Spirochaetes.

O aumento de táxons pertencentes ao filo Proteobacteria pode estar relacionado aos efeitos diretos e indiretos de mudanças da dieta dos indivíduos de cativo, como já sugerido por (McKenzie *et al.*, 2017), além de estar mais relacionada a variação funcional da microbiota, visto que este filo é uma importante fonte de genes de maior variabilidade entre os hospedeiros. Em humanos, o filo Proteobacteria foi relacionado como sendo um possível marcador para disbiose e um potencial critério de diagnóstico para doenças (Shin *et al.*, 2015). Desta forma, nossos achados podem ter implicações clínicas relacionadas a saúde intestinal dos macacos de cativo.

O filo Spirochaetes se destacou nos indivíduos de cativo pela alta abundância do gênero *Treponema*, principalmente da espécie *Treponema succinifaciens*, espécie comum na microbiota intestinal de populações humanas não urbanizadas (Angelakis *et al.*, 2019). O filo Cianobactéria/Melainabacteria (Di Rienzi *et al.*, 2013), mais abundante em indivíduos de vida livre, pode estar relacionado a ingestão de água do *habitat* natural destes indivíduos onde são há diversos lagos e nascentes.

Em indivíduos de vida livre observamos uma prevalência de táxons relacionados ao bem-estar e saúde do hospedeiro. Desde as famílias Prevotellaceae e Ruminococcae, (Rinninella *et al.*, 2019) até a espécie *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol *et al.*, 2008) e diferentes espécies de Prevotella e Ruminococcus.

A *Faecalibacterium prausnitzii*, vem sendo reportada em estudos de microbioma humano, sendo relacionada com indivíduos saudáveis estando presente em níveis reduzidos em indivíduos com doenças inflamatórias gastrointestinais (Laursen *et al.*, 2017). Esta espécie, tem sido sugerida como um marcador-chave de um intestino saudável (Martin *et al.*, 2017). Nossos resultados apontam para maior abundância de *Faecalibacterium* ($p < 0,01$) em indivíduos de vida livre, sugerindo que estes indivíduos podem apresentar uma microbiota mais saudável em relação aos indivíduos de cativeiro.

Já em indivíduos de cativeiro, destacamos a presença da família Christensenellaceae, também relacionado a saúde do hospedeiro, acredita-se que espécies deste gênero desempenham funções benéficas na comunidade bacteriana intestinal (van Opstal & Bordenstein, 2015). Outros trabalhos já relataram que este grupo aparece em animais de cativeiro que apresentam abundância reduzida de bactérias intestinais correlacionadas com a saúde do hospedeiro, como por exemplo *Prevotella* e *Ruminococcae* (McKenzie *et al.*, 2017), levantando a hipótese de que a medida que animais de cativeiro percam grupos relacionados a saúde do hospedeiro, ocorre um mecanismo alternativo para redução da disbiose intestinal, recrutando e aumentando a proliferação de espécies da família Christensenellaceae.

Além da família Christensenellaceae, os indivíduos de cativeiro apresentaram maior abundância de *Bacteroides* e *Parabacteroides*, gêneros relacionados entre si (Martens *et al.*, 2009), e encontrados em maior abundância em hospedeiros humanos que ingeriam uma dieta ocidental, mais ricas em proteínas e gorduras (Gorvitovskaia *et al.*, 2016).

A busca por um *core microbiome* ou “microbioma central” tem sido amplamente aplicada a comunidades microbianas taxonomicamente definidas, identificando grupos de bactérias que são particularmente prevalentes nas populações hospedeiras (Lundberg *et al.*, 2012; Kembel *et al.*, 2014; D Ainsworth *et al.*, 2015; Grieneisen *et al.*, 2017; Hernandez-Agrede *et al.*, 2017; Muletz Wolz *et al.*, 2018; Risely, 2020). De modo geral, o microbioma central refere-se a qualquer grupo de táxons bacterianos que são característicos do hospedeiro. Apesar da popularização do termo e crescente uso, há pouco consenso sobre como realmente quantificar o *core microbiome* (Neu *et al.*, 2021). Neste estudo, consideramos o microbioma central em nível de ASVs, em duas situações: presente em todos os indivíduos do grupo, ou 90% dos indivíduos do grupo. Observamos uma singularidade na maioria das ASVs CORE, 18 ASVs além de ser uma ASV CORE

de seu grupo, era exclusiva no grupo, sugerindo uma assinatura taxonômica do microbioma intestinal que pode ser particularmente importante para funções biológicas do hospedeiro (Turnbaugh *et al.*, 2007; Risely, 2020).

Em resumo, os indivíduos de cativeiro apresentaram menor diversidade e abundância relativa de táxons relacionados a saúde intestinal de primatas. Enquanto, os indivíduos de vida livre, apresentaram maior diversidade e abundância de grupos como *Faecalibacterium prausnitzii*, Prevotella, Ruminococcae e *Eubacterium eligens*, bactérias benéficas a saúde do hospedeiro (Valdes *et al.*, 2018). Os indivíduos de vida livre também apresentaram uma grande quantidade, mais que 50% da abundância relativa têm alta abundância relativa de ASVs desconhecidas a nível de gênero e até mesmo a níveis mais altos, como família e ordem.

3.3.2 Recuperação de genomas bacterianos (MAGs)

A recuperação de genomas montados a partir de dados de metagenômica (MAGs) tornou-se recentemente uma tarefa comum no estudo de microbiotas e microbiomas. Um MAG representa um genoma bacteriano montado a partir de sequências com propriedades semelhantes, isso nos permite identificar novas espécies, cultivadas ou não, e entender seu potencial papel em ambientes dinâmicos (Meziti *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

Neste trabalho, recuperamos 58 MAGs, sendo 22 de indivíduos de cativeiro e 36 de vida livre. Reforçando os resultados anteriores obtidos pelas análises taxonômicas de *amplicon* 16S e *shotgun*, os MAGs recuperados são característicos e inerentes de cada grupo analisado, cativeiro e vida livre. Diversos trabalhos comparam grupos cativos com selvagens (citar várias fontes), em sua grande maioria utilizam técnicas de metagenômica *shotgun* e *amplicon* 16S, mas esta mesma comparação com genomas recuperados ainda é escassa na literatura. Em estudo recente (Youngblut *et al.*, 2020) foi explorado o microbioma intestinal e a recuperação de genomas bacterianos em diferentes amostras fecais de animais vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes) representadas por 180 espécies, com até 6 indivíduos por espécie, sendo a maioria (81%) de indivíduos selvagens.

Dos 58 MAGs, 26 apontam para potenciais novas espécies bacterianas, a maioria deles (n=21) recuperados de bugios de vida livre. Estes 21 MAGs representam quase 60% dos MAGs recuperados das amostras de bugios de vida livre, revelando novidades taxonômicas e genomas específicos do hospedeiro, enquanto os MAGs de bugios de

cativoiro foram taxonomicamente classificados em grupos mais conhecidos. Estes resultados foram evidenciados quando comparamos nossos MAGs com catálogos públicos de genomas montados a partir de metagenomas.

O catálogo específico de microbiota intestinal de animais vertebrados contém 5.596 MAGs (Youngblut *et al.*, 2020). Quando comparamos nossos 58 MAGs com este catálogo, somente 7 MAGs tiveram ANI > 95% com uma referência. Interessantemente, todos os 7 MAGs foram recuperados de amostras de bugios de cativoiro e corresponderam a MAGs de amostras de 3 espécies de mamíferos: *Macaca fascicularis* (Li *et al.*, 2018) (BIN_08, BIN_20 e BIN_22), Porcos domésticos (Xiao *et al.*, 2016) (BIN_07, BIN_10 e BIN_19) e *Canis lupus familiaris* (BIN_15) (Coelho *et al.*, 2018). Apesar deste catálogo conter 4532 MAGs provenientes de animais de vida livre e apenas 1063 MAGs de animais domésticos ou de cativoiro, todas as equivalências com nossos MAGs foram procedentes de amostras de animais de cativoiro ou domésticos.

Tabela 19 Lista dos 7 MAGs que tiveram correspondência no catálogo de MAGs de animais vertebrados de Nicholas D. Youngblut e seus respectivos hospedeiros.

| ID | Animal |
|---------------|-------------------------------|
| BIN_08 | <i>Macaca fascicularis</i> |
| BIN_07 | Pig |
| BIN_22 | <i>Macaca fascicularis</i> |
| BIN_20 | <i>Macaca fascicularis</i> |
| BIN_10 | Pig |
| BIN_19 | Pig |
| BIN_15 | <i>Canis lupus familiaris</i> |

Outros dois grandes catálogos públicos de genomas montados a partir de metagenomas são: GEM (*Genomes from Earth's Microbiomes*), catálogo de 52.515 MAGs construído a partir de 10.450 metagenomas de diversos *habitats* e localização distintas (Nayfach *et al.*, 2021) e o UHGG (*Unified Human Gastrointestinal Genome*) (Almeida *et al.*, 2021). Quando comparamos nossos MAGs com essas duas bases de dados, os resultados fortaleceram a possibilidade dos MAGs de bugios de vida livre consistirem em novidades taxonômicas. Dos 36 MAGs, apenas 1, o BIN_55 classificado como CAG-239 da classe Alphaproteobacteria teve correspondência na base de dados do UHGG, tendo identidade >95% com o genoma MGYG-HGUT-02030, isolado de

amostras fecais de humanos na Espanha. Todos os outros 12 MAGs que tiveram correspondência no banco de dados do UHGG foram provenientes de bugios de cativeiro.

Quando comparamos nossos MAGs com o catálogo de genomas do GEM, apenas 7 MAGs de bugios de cativeiro tiveram genomas correspondentes. Este banco de dados analisou 10.450 metagenomas distribuídos globalmente a partir de diversos habitats, incluindo ambientes aquáticos (3.345), ambientes associados a hospedeiros humanos e animais (3.536), bem como solo e outros ambientes terrestres (1.919) (Nayfach *et al.*, 2021). Todos os genomas correspondentes foram recuperados de amostras fecais de primatas não humanos, rúmen ou associada a humanos, demonstrando conformidade com os nossos dados.

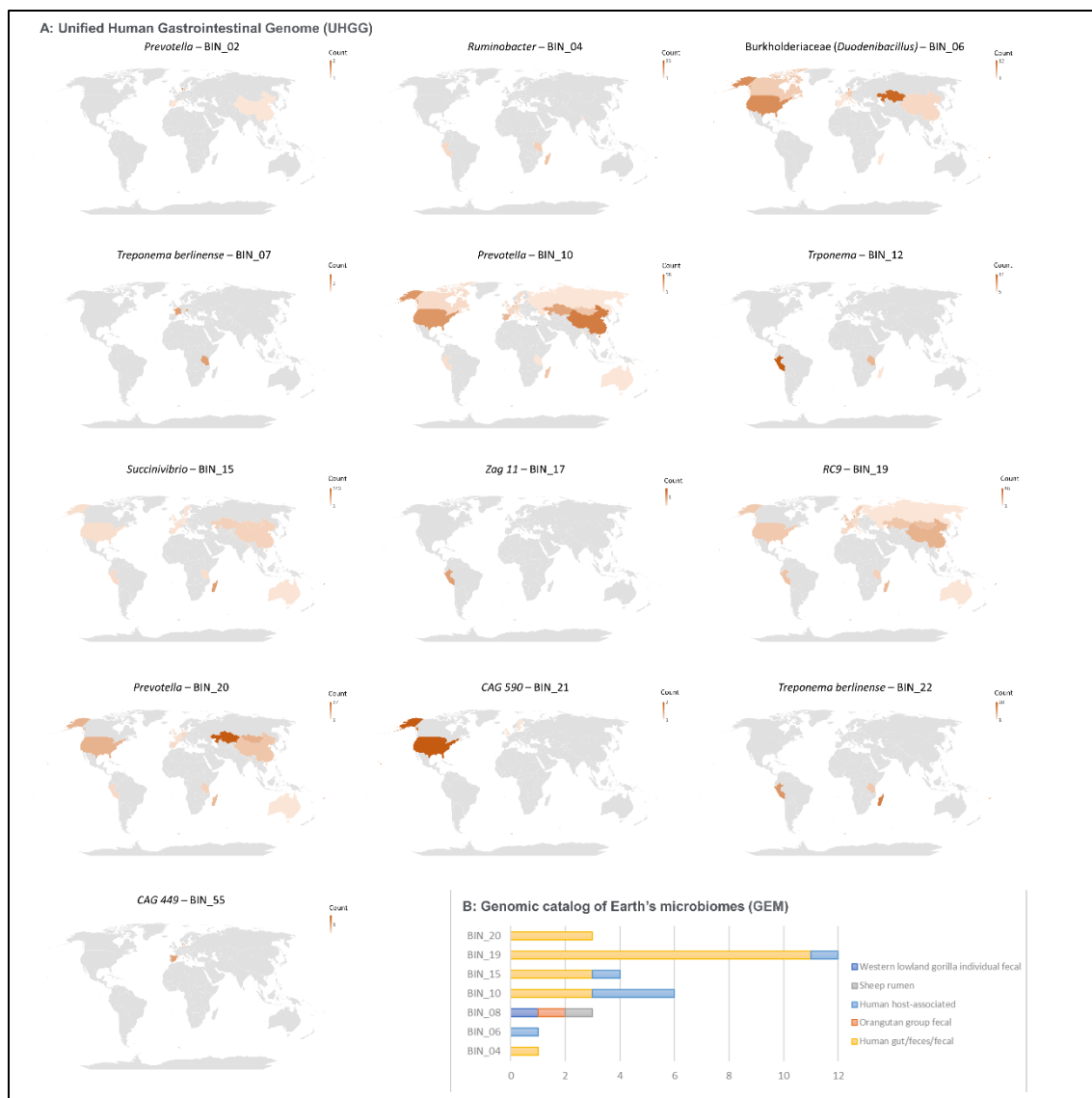


Figura 20: Comparação dos 58 MAGs com bancos públicos. A: Distribuição geográfica das referências dos 13 MAGs que tiveram correspondência no banco do UHGG. **B:** Ambiente onde foram coletadas as amostras das referências do banco de dados GEM dos 7 MAGs correspondentes.

3.3.3 Perfil funcional e análise de genes de resistência

O microbioma intestinal é um ecossistema diversificado com múltiplas funções metabólicas e imunológicas associadas à dieta e estilo de vida do hospedeiro (Gupta *et al.*, 2017; Zinöcker & Lindseth, 2018; Conteville *et al.*, 2019). Nossos resultados mostraram uma clara separação no perfil funcional entre bugios de cativo e vida livre.

As análises funcionais mais aprofundadas foram realizadas visando avaliar o potencial de degradação de biomassa em MAGs, pois macacos bugios retiram

aproximadamente 30% da energia diária que necessitam para sobreviver a partir de processos fibrolíticos da degradação microbiana de nutrientes vegetais adquiridos na dieta (Amato *et al.*, 2016a; Amato *et al.*, 2016c). Esse processo resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta, em *A. palliata* resultando em 93,7% acetato, 5,9% propionato e 0,4% butirato (Milton & McBee, 1983) oriundos da degradação de biomassa através da microbiota intestinal desses bugios.

Sabe-se que os SCAFs podem ser sintetizados por diferentes vias metabólicas, o acetato geralmente é derivado do piruvato ou acetil-CoA, porém também pode ser formado pela via Wood-Ljungdahl; o propionato é produzido principalmente pela via do succinato, mas também pode ser derivado das vias do acrilato e do propanodiol; o butirato é derivado principalmente do butiril-CoA (Zhao *et al.*, 2019).

Em nossas análises, selecionamos um grupo de enzimas relacionadas a síntese destes SCAFs, porém não descartamos a possibilidade outros genes contribuírem para a síntese destes compostos. Nossos resultados mostraram que nos 58 MAGs recuperados, nenhum apresentou a enzima *Propionate CoA-transferase* (EC:2.8.3.1), indicando a ausência de produção de propanato.

O SCAF mais representado a partir das análises dos MAGs foi o acetato. As enzimas relacionadas a produção de acetato estão codificadas em quase todos os MAGs (93%). Apenas 4 MAGs não apresentaram pelo menos uma enzima relacionada a produção de acetato. Isso já era esperado, pois o acetato é produzido pela maioria dos membros da microbiota intestinal, e apenas certos grupos bacterianos filogeneticamente distintos produzem butirato e propanato (Louis & Flint, 2017). O acetato já foi descrito em níveis altos em fezes de humanos (41%) e primatas não humanos (33%) (Nagpal *et al.*, 2018). Este mesmo trabalho mostrou que o butirato foi o SCAF encontrado com menor abundância em primatas não humano, com 3%.

O papel da ingestão de fibras e produção de SCFAs, por si só, na manutenção da homeostase e saúde do hospedeiro ainda é muito discutido e uma área de pesquisa ativa (Portincasa *et al.*, 2022). Neste trabalho, não encontramos diferença significativa na degradação de biomassa e a produção de SCAFs quando comparamos os MAGs dos bugios de vida livre e cativeiro. Mas considerando que os genomas recuperados de metagenomas (MAGs) são os táxons que teoricamente estão em maior abundância na amostra, a presença de enzimas degradadoras de biomassa e enzimas relacionadas a

produção de acetato e butirato nestes MAGs, indicam a presença de uma comunidade bacteriana enriquecida em produtoras de SCAFs.

A análise ARGs indicou que a microbiota de bugios de cativeiro carrega mais genes de resistência a antibióticos quando comparado a bugios de vida livre. Animais selvagens normalmente não entram em contato com antibióticos, mas sua relação direta ou indireta com humanos ou ambiente humanizado pode levar ao uso de agentes seletivos, comensais de humanos e outras espécies (Torres *et al.*, 2021). Nossos resultados, mostraram que a microbiota de bugios de vida livre também apresentou alguns genes de resistência a antibiótico, apesar de não receberem esse tipo de tratamento, como acontece em indivíduos de cativeiro. Está descrito que genes de resistência a antimicrobianos são encontrados em microrganismos ambientais e associados a animais selvagens (Palmeira *et al.*, 2021).

As análises de MAGs indicaram que o BIN_07, classificado como *Treponema berlinense*, foi o único MAG que apresentou um gene de resistência com o mecanismo de “alteração de alvo” os demais genes classificados nos MAGs foram relacionados a bombas de efluxo, o que pode não representar resistência propriamente dita, pois esse tipo de mecanismo pode estar relacionado com um ou mais genes de redes regulatórias (Li & Nikaido, 2009).

A influência da vida selvagem na persistência e disseminação de resistência a antibióticos é muitas vezes negligenciada (Tausova *et al.*, 2012). O uso indiscriminado de agentes antibacterianos semelhantes na medicina humana e veterinária contribuiu para a seleção de bactérias AMR e sua distribuição na natureza (Skarżyńska *et al.*, 2020). Nossos resultados mostraram a importância de uma avaliação global prévia, antecedendo possíveis estratégias de reintrodução de animais cativos a natureza, pois poderiam disseminar esses genes em seu *habitat* natural.

CONCLUSÃO

Nesta tese investigamos o microbioma fecal de macacos bugios com diferentes abordagens dependente e independentes de cultivo. Os resultados dessas abordagens mostraram uma clara diferença no microbioma de macacos bugios de cativeiro e de vida livre. Concluímos o Banco de Isolados Bacterianos de Macacos Bugio (BIBMB), consolidando um estoque de linhagens bacterianas nativas que poderão ser adicionalmente caracterizadas e utilizadas em futuras pesquisas, processos e obtenção de produtos de interesse biotecnológico. A caracterização genômica de dois isolados bacterianos já mostrou a importância desta coleção revelando um isolado como forte candidato a nova espécie do gênero *Pseudochrobactrum* e um isolado classificado como *Limosilactobacillus gorillae* com características genômicas essenciais para um organismo probiótico.

A combinação do sequenciamento de *amplicons* (região V3-V4) do gene do rRNA16S e metagenômica *shotgun* gerou resultados de alta sensibilidade e especificidade sobre a microbiota dos macacos bugios. Nossos resultados mostraram que táxons relacionados a saúde do hospedeiro, como as famílias *Prevotellaceae* e *Ruminococcae*; os gêneros *Prevotella* e *Ruminococcus* e a espécie *Faecalibacterium prausnitzii* se encontram em maior abundância relativa no grupo de vida livre. Também foi possível a recuperação de 58 MAGs, sendo que 26 apontam para potenciais novas espécies bacterianas, a maioria deles (n=21) recuperados de bugios de vida livre, revelando possíveis novidades taxonômicas.

Nosso trabalho foi o primeiro a realizar um estudo abrangente do microbioma de macacos bugios da espécie *Alouatta caraya* (bugio-preto-e-ruivo) e *Alouatta guariba clamitans* (bugio-ruivo) de cativeiro e vida livre. Os resultados obtidos possibilitam um melhor entendimento do papel funcional desta microbiota na saúde do hospedeiro e poderá auxiliar no planejamento de estratégias de reintrodução de animais de cativeiro em seu *habitat* natural bem como para o aprimoramento do manejo de animais de cativeiro.

REFERÊNCIAS

1. **Abadi, A. T., Mobarez, A. M., Bonten, M. J., Wagenaar, J. A. & Kusters, J. G.** 2014. Clinical relevance of the *cagA*, *tnpA* and *tnpB* genes in *Helicobacter pylori*. *BMC Gastroenterol* 14:33. **Doi:** 10.1186/1471-230x-14-33
2. **Ahmed, H., Leyrolle, Q., Koistinen, V., Karkkainen, O., Laye, S., Delzenne, N. & Hanhineva, K.** 2022. Microbiota-derived metabolites as drivers of gut-brain communication. *Gut Microbes* 14. **Doi:** 10.1080/19490976.2022.2102878
3. **Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M. et al.** 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517-d525. **Doi:** 10.1093/nar/gkz935
4. **Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D. & Finn, R. D.** 2019. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 568:499-504. **Doi:** 10.1038/s41586-019-0965-1
5. **Alou, M. T., Naud, S., Khelaifia, S., Bonnet, M., Lagier, J. C. & Raoult, D.** 2021. State of the Art in the Culture of the Human Microbiota: New Interests and Strategies. *Clinical Microbiology Reviews* 34. **Doi:** 10.1128/cmr.00129-19
6. **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10. **Doi:** 10.1016/s0022-2836(05)80360-2
7. **Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-69. **Doi:** 10.1128/mr.59.1.143-169.1995
8. **Amato, K. R., Leigh, S. R., Kent, A., Mackie, R. I., Yeoman, C. J., Stumpf, R. M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. & Garber, P. A.** 2014. The Role of Gut Microbes in Satisfying the Nutritional Demands of Adult and Juvenile Wild, Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*). *American Journal of Physical Anthropology* 155:652-664. **Doi:** 10.1002/ajpa.22621
9. **Amato, K. R., Leigh, S. R., Kent, A., Mackie, R. I., Yeoman, C. J., Stumpf, R. M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. & Garber, P. A.** 2015. The Gut Microbiota Appears to Compensate for Seasonal Diet Variation in the Wild Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*). *Microbial Ecology* 69:434-443. **Doi:** 10.1007/s00248-014-0554-7
10. **Amato, K. R., Mallott, E. K., McDonald, D., Dominy, N. J., Goldberg, T., Lambert, J. E., Swedell, L., Metcalf, J. L., Gomez, A., Britton, G. A., Stumpf, R. M., Leigh, S. R. & Knight, R.** 2019. Convergence of human and Old World monkey gut microbiomes demonstrates the importance of human ecology over phylogeny. *Genome Biology* 20. **Doi:** 10.1186/s13059-019-1807-z
11. **Amato, K. R., Martinez-Mota, R., Righini, N., Raguét-Schofield, M., Corcione, F. P., Marini, E., Humphrey, G., Gogul, G., Gaffney, J., Lovelace, E., Williams, L., Luong, A., Dominguez-Bello, M. G., Stumpf, R. M., White, B., Nelson, K. E., Knight, R. & Leigh, S. R.** 2016a. Phylogenetic and ecological factors impact the gut microbiota of two Neotropical primate species. *Oecologia* 180:717-733. **Doi:** 10.1007/s00442-015-3507-z
12. **Amato, K. R., Metcalf, J. L., Song, S. J., Hale, V. L., Clayton, J., Ackermann, G., Humphrey, G., Niu, K. F., Cui, D. Y., Zhao, H. X., Schrenzel, M. D., Tan, C. L., Knight, R. & Braun, J.** 2016b. Using the gut microbiota as a novel tool

- for examining colobine primate GI health. *Global Ecology and Conservation* 7:225-237. **Doi:** 10.1016/j.gecco.2016.06.004
13. **Amato, K. R., Van Belle, S., Di Fiore, A., Estrada, A., Stumpf, R., White, B., Nelson, K. E., Knight, R. & Leigh, S. R.** 2017. Patterns in Gut Microbiota Similarity Associated with Degree of Sociality among Sex Classes of a Neotropical Primate. *Microbial Ecology* 74:250-258. **Doi:** 10.1007/s00248-017-0938-6
 14. **Amato, K. R., Yeoman, C. J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., Gaskins, H. R., Stumpf, R. M., Yildirim, S., Torralba, M., Gillis, M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. & Leigh, S. R.** 2013. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *Isme Journal* 7:1344-1353. **Doi:** 10.1038/ismej.2013.16
 15. **Andrade, R. d. O.** 2018. Ameaças aos macacos, p. 49-51, *Revista Pesquisa FAPESP*, vol. 270. FAPESP, São Paulo.
 16. **Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R. & Göker, M.** 2006. Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences. *BMC Bioinformatics* 7:350. **Doi:** 10.1186/1471-2105-7-350
 17. **Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H. P. & Göker, M.** 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* 2:117-34. **Doi:** 10.4056/sigs.531120
 18. **Auricchio, P.** 1995. *Primatas do Brasil*. Terra Brasilis Editora Ltda.
 19. **Backhed, F.** 2011. Programming of Host Metabolism by the Gut Microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism* 58:44-52. **Doi:** 10.1159/000328042
 20. **Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T. & Nielsen, J. L.** 2016. The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics* 2016. **Doi:** 10.1155/2016/5304028
 21. **Baniel, A., Amato, K. R., Beehner, J. C., Bergman, T. J., Mercer, A., Perlman, R. F., Petrullo, L., Reitsema, L., Sams, S., Lu, A. & Snyder-Mackler, N.** 2021. Seasonal shifts in the gut microbiome indicate plastic responses to diet in wild geladas. *Microbiome* 9:26. **Doi:** 10.1186/s40168-020-00977-9
 22. **Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. & Pevzner, P. A.** 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455-77. **Doi:** 10.1089/cmb.2012.0021
 23. **Barelli, C., Albanese, D., Stumpf, R. M., Asangba, A., Donati, C., Rovero, F. & Hauffe, H. C.** 2020. The Gut Microbiota Communities of Wild Arboreal and Ground-Feeding Tropical Primates Are Affected Differently by Habitat Disturbance. *mSystems* 5. **Doi:** 10.1128/mSystems.00061-20
 24. **Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C. et al.** 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8:103. **Doi:** 10.1186/s40168-020-00875-0
 25. **Bilen, M., Dufour, J.-C., Lagier, J.-C., Cadoret, F., Daoud, Z., Dubourg, G. & Raoult, D.** 2018. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome* 6:94. **Doi:** 10.1186/s40168-018-0485-5
 26. **Bletz, M. C., Goedbloed, D. J., Sanchez, E., Reinhardt, T., Tebbe, C. C., Bhujju, S., Geffers, R., Jarek, M., Vences, M. & Steinfartz, S.** 2016. Amphibian gut microbiota shifts differentially in community structure but converges on habitat-

- specific predicted functions. *Nature Communications* 7:ARTN 13699. **Doi:** 10.1038/ncomms13699
27. **Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A. & Caporaso, J. G.** 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10:57-59. **Doi:** 10.1038/nmeth.2276
 28. **Boulos, M. & Gatti, É.** 2018. O alarme dos macacos, p. 19-23, *Revista Pesquisa FAPESP*, vol. 263. FAPESP, São Paulo.
 29. **Bravo, S. P.** 2022. The role of howler monkeys (*Alouatta caraya*) in the primary succession of the Parana flooded forest (Argentina). *Biotropica* 54:71-77. **Doi:** 10.1111/btp.13028
 30. **Callahan, B. J., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P.** 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11:2639-2643. **Doi:** 10.1038/ismej.2017.119
 31. **Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. & Holmes, S. P.** 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581-+. **Doi:** 10.1038/nmeth.3869
 32. **Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P. & Huerta-Cepas, J.** 2021. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution* 38:5825-5829. **Doi:** 10.1093/molbev/msab293
 33. **Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D. et al.** 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336. **Doi:** 10.1038/nmeth.f.303
 34. **Carneiro, L. D., Moreno, T. B., Fernandes, B. D., Souza, C. M. M., Bastos, T. S., Felix, A. P. & da Rocha, C.** 2021. Effects of two dietary fiber levels on nutrient digestibility and intestinal fermentation products in captive brown howler monkeys (*Alouatta guariba*). *American Journal of Primatology* 83. **Doi:** 10.1002/ajp.23238
 35. **Carr, J., Kleiman, S. C., Bulik, C. M., Bulik-Sullivan, E. C. & Carroll, I. M.** 2016. Can attention to the intestinal microbiota improve understanding and treatment of anorexia nervosa? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 10:565-569. **Doi:** 10.1586/17474124.2016.1166953
 36. **Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P. & Parks, D. H.** 2019. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36:1925-1927. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btz848
 37. **Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P. & Parks, D. H.** 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36:1925-1927. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btz848
 38. **Chaves, Ó. M. & Bicca-Marques, J. C.** 2017. Crop Feeding by Brown Howlers (*Alouatta guariba clamitans*) in Forest Fragments: The Conservation Value of Cultivated Species. *International Journal of Primatology* 38:263-281. **Doi:** 10.1007/s10764-016-9927-8
 39. **Chen, I. A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J. R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S. P., Woyke, T., Eloe-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N. & Kyrpides, N. C.** 2019. IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Res* 47:D666-d677. **Doi:** 10.1093/nar/gky901

40. **Chen, L. X., Anantharaman, K., Shaiber, A., Eren, A. M. & Banfield, J. F.** 2020a. Accurate and complete genomes from metagenomes. *Genome Research* 30:315-333. **Doi:** 10.1101/gr.258640.119
41. **Chen, T., Li, Y., Liang, J., Li, Y. & Huang, Z.** 2020b. Gut microbiota of provisioned and wild rhesus macaques (*Macaca mulatta*) living in a limestone forest in southwest Guangxi, China. *Microbiology Open* 9:e981. **Doi:** 10.1002/mbo3.981
42. **Cheng, Y. Y., Fox, S., Pemberton, D., Hogg, C., Papenfuss, A. T. & Belov, K.** 2015. The Tasmanian devil microbiome-implications for conservation and management. *Microbiome* 3. **Doi:** 10.1186/s40168-015-0143-0
43. **Chevreux, B., Pfisterer, T., Drescher, B., Driesel, A. J., Müller, W. E. G., Wetter, T. & Suhai, S.** 2004. Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. *Genome Research* 14:1147-1159. **Doi:** 10.1101/gr.1917404
44. **Coil, D., Jospin, G. & Darling, A. E.** 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31:587-9. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btu661
45. **Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaansen, T. F. S. et al.** 2019. The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews* 99:1877-2013. **Doi:** 10.1152/physrev.00018.2018
46. **Dallas, J. W. & Warne, R. W.** 2022. Captivity and Animal Microbiomes: Potential Roles of Microbiota for Influencing Animal Conservation. *Microbial Ecology*. **Doi:** 10.1007/s00248-022-01991-0
47. **de Jonge, N., Carlsen, B., Christensen, M. H., Pertoldi, C. & Nielsen, J. L.** 2022. The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species. *Frontiers in Microbiology* 13. **Doi:** 10.3389/fmicb.2022.886252
48. **Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B. & Terrapon, N.** 2021. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research* 50:D571-D577. **Doi:** 10.1093/nar/gkab1045
49. **Duffy, P. X., Wellian, J. & Smith, R. L.** 2022. Use of Space by black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in an urban environment in Paraguay. *Urban Ecosystems*. **Doi:** 10.1007/s11252-022-01262-3
50. **Eddy, S. R.** 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7:e1002195. **Doi:** 10.1371/journal.pcbi.1002195
51. **Edgar, R. C.** 2018. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 34:2371-2375. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/bty113
52. **Eren, A. M., Esen, Ö. C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L. & Delmont, T. O.** 2015. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ* 3:e1319. **Doi:** 10.7717/peerj.1319
53. **Eren, A. M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S. E. et al.** 2021. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. *Nat Microbiol* 6:3-6. **Doi:** 10.1038/s41564-020-00834-3
54. **Estrada, A., Garber, P. A., Mittermeier, R. A., Wich, S., Gouveia, S. et al.** 2018. Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. *PeerJ* 6:e4869. **Doi:** 10.7717/peerj.4869
55. **Fernani, D. M., Kowalewski, M. M. & Fernández, V. A.** 2020. Germination of native and exotic seeds dispersed by wild black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*): assessing deinhibition and scarification effects. *Primates* 61:519-527. **Doi:** 10.1007/s10329-020-00791-9

56. **Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L., Owens, S., Gilbert, J. A., Wall, D. H. & Caporaso, J. G.** 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:21390-21395. **Doi:** 10.1073/pnas.1215210110
57. **Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C. & Huttenhower, C.** 2015. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nature Reviews Microbiology* 13:360-372. **Doi:** 10.1038/nrmicro3451
58. **Frioux, C., Singh, D., Korcsmaros, T. & Hildebrand, F.** 2020. From bag-of-genes to bag-of-genomes: metabolic modelling of communities in the era of metagenome-assembled genomes. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:1722-1734. **Doi:** 10.1016/j.csbj.2020.06.028
59. **Fuzessy, L., Sobral, G. & Culot, L.** 2022. Linking howler monkey ranging and defecation patterns to primary and secondary seed dispersal. *American Journal of Primatology* 84. **Doi:** 10.1002/ajp.23354
60. **Gilbert, J. A., Jansson, J. K. & Knight, R.** 2014. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *Bmc Biology* 12. **Doi:** ARTN 69
10.1186/s12915-014-0069-1
61. **Gomez, A., Sharma, A. K., Mallott, E. K., Petrzekova, K. J., Robinson, C. A. J. et al.** 2019. Plasticity in the Human Gut Microbiome Defies Evolutionary Constraints. *Msphere* 4. **Doi:** 10.1128/mSphere.00271-19
62. **Goodrich, Julia K., Di Rienzi, Sara C., Poole, Angela C., Koren, O., Walters, William A., Caporaso, J. G., Knight, R. & Ley, Ruth E.** 2014. Conducting a Microbiome Study. *Cell* 158:250-262. **Doi:** 10.1016/j.cell.2014.06.037
63. **Gregorin, R.** 2006. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23:64–144. **Doi:** 10.1590/s0101-81752006000100005
64. **Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G.** 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072-5. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btt086
65. **Hale, V. L., Tan, C. L., Niu, K. F., Yang, Y. Q., Cui, D. Y., Zhao, H. X., Knight, R. & Amato, K. R.** 2016. Effects of field conditions on fecal microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 130:180-188. **Doi:** 10.1016/j.mimet.2016.09.017
66. **Hale, V. L., Tan, C. L., Niu, K. F., Yang, Y. Q., Knight, R., Zhang, Q. K., Cui, D. Y. & Amato, K. R.** 2018. Diet Versus Phylogeny: a Comparison of Gut Microbiota in Captive Colobine Monkey Species. *Microbial Ecology* 75:515-527. **Doi:** 10.1007/s00248-017-1041-8
67. **Hale, V. L., Tan, C. L., Niu, K. F., Yang, Y. Q., Zhang, Q. K., Knight, R. & Amato, K. R.** 2019. Gut microbiota in wild and captive Guizhou snub-nosed monkeys, *Rhinopithecus brelichi*. *American Journal of Primatology* 81. **Doi:** 10.1002/ajp.22989
68. **Hamady, M. & Knight, R.** 2009. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res* 19:1141-52. **Doi:** 10.1101/gr.085464.108
69. **Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M.** 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:R245-9. **Doi:** 10.1016/s1074-5521(98)90108-9

70. **Hernandez-Rodriguez, D., Vasquez-Aguilar, A. A., Serio-Silva, J. C., Rebollar, E. A. & Azaola-Espinosa, A.** 2019. Molecular detection of *Bifidobacterium* spp. in faeces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Journal of Medical Primatology* 48:99-105. **Doi:** 10.1111/jmp.12395
71. **Hicks, A. L., Lee, K. J., Couto-Rodriguez, M., Patel, J., Sinha, R., Guo, C., Olson, S. H., Seimon, A., Seimon, T. A., Ondzie, A. U., Karesh, W. B., Reed, P., Cameron, K. N., Lipkin, W. I. & Williams, B. L.** 2018. Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nature Communications* 9. **Doi:** 10.1038/s41467-018-04204-w
72. **Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. & Sanders, M. E.** 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506-14. **Doi:** 10.1038/nrgastro.2014.66
73. **Hirsch, A., Dias, L., Martins, L., Campos, R., Landau, E. & Resende, N.** 2002. BDGEOPRIM: Database of geo-referenced localities of Neotropical primates. *Neotropical Primates* 10:79-84. **Doi:**
74. **Hugerth, L. W. & Andersson, A. F.** 2017. Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers in Microbiology* 8. **Doi:** 10.3389/fmicb.2017.01561
75. **Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H. et al.** 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214. **Doi:** 10.1038/nature11234
76. **Idoeta, P. A.** 2015. Em projeto de 'repovoamento', bugios são introduzidos no Parque Nacional da Tijuca, BBC Brasil São Paulo.
77. **IJSEM.** 2009. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 58, part 10, of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:3-4. **Doi:** <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010686-0>
78. **Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T. & Aluru, S.** 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications* 9:5114. **Doi:** 10.1038/s41467-018-07641-9
79. **Jardim, M. M. A., Queirolo, D., Peters, F. B., Mazim, F. D., Favarini, M. O., Tirelli, F. P., Trindade, R. A., Bonatto, S. L., Bicca-Marques, J. C. & Mourthe, I.** 2020. Southern extension of the geographic range of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Mammalia* 84:102-106. **Doi:** 10.1515/mammalia-2018-0127
80. **Jia, T., Chang, W. S., Marcelino, V. R., Zhao, S. F., Liu, X. F., You, Y. Y., Holmes, E. C., Shi, M. & Zhang, C. L.** 2022. Characterization of the Gut Microbiome and Resistomes of Wild and Zoo-Captive Macaques. *Frontiers in Veterinary Science* 8. **Doi:** 10.3389/fvets.2021.778556
81. **Kämpfer, P., Huber, B., Lodders, N., Warfolomeow, I., Busse, H.-J. & Scholz, H. C.** 2009. *Pseudochrobactrum lubricantis* sp. nov., isolated from a metal-working fluid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2464-2467. **Doi:** <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008540-0>
82. **Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Scholz, H. C., Welinder-Olsson, C., Falsen, E. & Busse, H.-J.** 2006. Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum*

- saccharolyticum sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1823-1829. Doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64256-0>
83. **Kämpfer, P., Scholz, H., Huber, B., Thumm, K., Busse, H.-J., Maas, E. W. & Falsen, E.** 2007. Description of *Pseudochrobactrum kiredjiana* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:755-760. Doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64714-0>
 84. **Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M.** 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44:D457-62. Doi: 10.1093/nar/gkv1070
 85. **Karvelis, T., Druteika, G., Bigelyte, G., Budre, K., Zedaveinyte, R., Silanskas, A., Kazlauskas, D., Venclovas, Č. & Siksnyš, V.** 2021. Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. *Nature* 599:692-696. Doi: 10.1038/s41586-021-04058-1
 86. **Kers, J. G. & Saccetti, E.** 2022. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Frontiers in Microbiology* 12. Doi: 10.3389/fmicb.2021.796025
 87. **Kim, C. Y., Lee, M., Yang, S., Kim, K., Yong, D., Kim, H. R. & Lee, I.** 2021. Human reference gut microbiome catalog including newly assembled genomes from under-represented Asian metagenomes. *Genome Medicine* 13. Doi: 10.1186/s13073-021-00950-7
 88. **Kitrinos, C., Bell, R. B., Bradley, B. J. & Kamilar, J. M.** 2022. Hair Microbiome Diversity within and across Primate Species. *Msystems*. Doi: 10.1128/mystems.00478-22
 89. **Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glockner, F. O.** 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41. Doi: ARTN e1
10.1093/nar/gks808
 90. **Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C. et al.** 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology* 16:410-422. Doi: 10.1038/s41579-018-0029-9
 91. **Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F.** 2016. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165:1332-1345. Doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041
 92. **Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M.** 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:2567-2572. Doi: doi:10.1073/pnas.0409727102
 93. **Kowalewski, M. M., Garber, P. A., Cortés-Ortiz, L., Urbani, B. & Youlatos, D.** 2014. *Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation*. Springer New York.
 94. **Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K. & Hugenholtz, P.** 2008. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72:557-578. Doi: doi:10.1128/MMBR.00009-08
 95. **Lagier, J. C., Khelaifia, S., Alou, M. T., Ndongo, S., Dione, N. et al.** 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology* 1. Doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.203
 96. **Lam, K. N., Cheng, J., Engel, K., Neufeld, J. D. & Charles, T. C.** 2015. Current and future resources for functional metagenomics. *Frontiers in Microbiology* 6. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01196

97. **Lambo, M. T., Chang, X. & Liu, D.** 2021. The Recent Trend in the Use of Multistrain Probiotics in Livestock Production: An Overview. *Animals (Basel)* 11. **Doi:** 10.3390/ani11102805
98. **Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Thurber, R. L. V., Knight, R., Beiko, R. G. & Huttenhower, C.** 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* 31:814-+. **Doi:** 10.1038/nbt.2676
99. **Lau, J. T., Whelan, F. J., Herath, I., Lee, C. H., Collins, S. M., Bercik, P. & Surette, M. G.** 2016. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Medicine* 8. **Doi:** ARTN 72
10.1186/s13073-016-0327-7
100. **Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Verhoeven, T. L., Fadda, A. A., Marchal, K. & Vanderleyden, J.** 2007. Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J Bacteriol* 189:860-71. **Doi:** 10.1128/jb.01394-06
101. **Lesker, T. R., Durairaj, A. C., Galvez, E. J. C., Lagkouvardos, I., Baines, J. F., Clavel, T., Sczyrba, A., McHardy, A. C. & Strowig, T.** 2020. An Integrated Metagenome Catalog Reveals New Insights into the Murine Gut Microbiome. *Cell Reports* 30:2909-+. **Doi:** 10.1016/j.celrep.2020.02.036
102. **Levin, D., Raab, N., Pinto, Y., Rothschild, D., Zanir, G., Godneva, A., Mellul, N., Futorian, D., Gal, D., Leviatan, S., Zeevi, D., Bachelet, I. & Segal, E.** 2021. Diversity and functional landscapes in the microbiota of animals in the wild. *Science* 372:254-+. **Doi:** 10.1126/science.abb5352
103. **Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R. & Gordon, J. I.** 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 320:1647-1651. **Doi:** doi:10.1126/science.1155725
104. **Li, X., Trivedi, U., Brejnrod, A. D., Vestergaard, G., Mortensen, M. S., Bertelsen, M. F. & Sørensen, S. J.** 2020. The microbiome of captive hamadryas baboons. *Animal Microbiome* 2:25. **Doi:** 10.1186/s42523-020-00040-w
105. **Liu, J., Tan, Y., Cheng, H., Zhang, D., Feng, W. & Peng, C.** 2022. Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. *Aging and disease* 13:1106-1126. **Doi:** 10.14336/ad.2022.0104
106. **Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G. & Huttenhower, C.** 2016. The healthy human microbiome. *Genome Medicine* 8:51. **Doi:** 10.1186/s13073-016-0307-y
107. **Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O. & Huttenhower, C.** 2017. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* 550:61-66. **Doi:** 10.1038/nature23889
108. **Loperena-Barber, M., Khames, M., Leclercq, S. O., Zygmunt, M. S., Babot, E. D., Zúñiga-Ripa, A., Gutiérrez, A., Oumouna, M., Moriyón, I., Cloeckert, A. & Conde-Álvarez, R.** 2022. *Pseudochrobactrum algeriensis* sp. nov., isolated from lymph nodes of Algerian cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72. **Doi:** <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005223>
109. **Ludwig, W., Glockner, F. O. & Yilmaz, P.** 2011. The Use of rRNA Gene Sequence Data in the Classification and Identification of Prokaryotes. *Methods in Microbiology, Vol 38: Taxonomy of Prokaryotes* 38:349-384. **Doi:** 10.1016/B978-0-12-387730-7.00016-4

110. **Mallott, E. K. & Amato, K. R.** 2021. Host specificity of the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 19:639-653. **Doi:** 10.1038/s41579-021-00562-3
111. **Mallott, E. K., Skovmand, L. H., Garber, P. A. & Amato, K. R.** 2022. The faecal metabolome of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) varies in response to seasonal dietary changes. *Molecular Ecology*. **Doi:** 10.1111/mec.16559
112. **Mangiaterra, S., Schmidt-Küntzel, A., Marker, L., Di Cerbo, A., Piccinini, R., Guadagnini, D., Turba, M. E., Berardi, S., Galosi, L., Preziuso, S., Cerquetella, M. & Rossi, G.** 2022. Effect of a Probiotic Mixture in Captive Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) with Gastrointestinal Symptoms-A Pilot Study. *Animals (Basel)* 12. **Doi:** 10.3390/ani12030395
113. **Martinez-Mota, R., Righini, N., Mallott, E. K., Palme, R. & Amato, K. R.** 2022. Environmental Stress and the Primate Microbiome: Glucocorticoids Contribute to Structure Gut Bacterial Communities of Black Howler Monkeys in Anthropogenically Disturbed Forest Fragments. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10. **Doi:** 10.3389/fevo.2022.863242
114. **Martino, C., Dilmore, A. H., Burcham, Z. M., Metcalf, J. L., Jeste, D. & Knight, R.** 2022. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nature Reviews Microbiology*. **Doi:** 10.1038/s41579-022-00768-z
115. **Martins, A., Martins da Silva, J. F., Sampaio, P. & Lima, N.** 2022. Chapter 7 - Quality and competence management in microbial biobanks, p. 157-192. *In* Ī. Kurtböke (ed.), *Importance of Microbiology Teaching and Microbial Resource Management for Sustainable Futures*. Academic Press. **Doi:**<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818272-7.00009-2>
116. **Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L. & Göker, M.** 2021. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 50:D801-D807. **Doi:** 10.1093/nar/gkab902
117. **Meier-Kolthoff, J. P. & Göker, M.** 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10:2182. **Doi:** 10.1038/s41467-019-10210-3
118. **Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P. & Göker, M.** 2014. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:352-356. **Doi:** 10.1099/ij.s.0.056994-0
119. **Milton, K. & McBee, R. H.** 1983. Rates of fermentative digestion in the howler monkey, *Alouatta palliata* (primates: ceboidea). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 74:29-31. **Doi:** 10.1016/0300-9629(83)90706-5
120. **Moeller, A. H., Li, Y. Y., Ngole, E. M., Ahuka-Mundeke, S., Lonsdorf, E. V., Pusey, A. E., Peeters, M., Hahn, B. H. & Ochman, H.** 2014. Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:16431-16435. **Doi:** 10.1073/pnas.1419136111
121. **Moriyama, V.** 2018. Surto de febre amarela está dizimando bugios de São Paulo, *National Geographic Brasil*.
122. **Nakamura, N., Amato, K. R., Garber, P., Estrada, A., Mackie, R. I. & Gaskins, H. R.** 2011. Analysis of the Hydrogenotrophic Microbiota of Wild and Captive Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) in Palenque National Park, Mexico. *American Journal of Primatology* 73:909-919. **Doi:** 10.1002/ajp.20961
123. **Narat, V., Amato, K. R., Ranger, N., Salmons, M., Mercier-Delarue, S., Rupp, S., Ambata, P., Njouom, R., Simon, F., Giles-Vernick, T. & LeGoff, J.** 2020. A multi-disciplinary comparison of great ape gut microbiota in a central African

- forest and European zoo. *Scientific Reports* 10. **Doi:** 10.1038/s41598-020-75847-3
124. **Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udvary, D., Varghese, N. et al.** 2021. A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology* 39:499-+. **Doi:** 10.1038/s41587-020-0718-6
 125. **Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S. & Kyrpides, N. C.** 2019. New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature* 568:505-+. **Doi:** 10.1038/s41586-019-1058-x
 126. **ND+.** 2020. Bugios podem reaparecer em Florianópolis após nascimento de dois filhotes, ND+ Florianópolis.
 127. **Nelson, K. E., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Worley, K. C., Creasy, H. H. et al.** 2010. A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science* 328:994-9. **Doi:** 10.1126/science.1183605
 128. **Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M. & White, B.** 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms and Microbiomes* 2:16004. **Doi:** 10.1038/npjbiofilms.2016.4
 129. **Nishida, A. H. & Ochman, H.** 2019. A great-ape view of the gut microbiome. *Nature Reviews Genetics* 20:195-206. **Doi:** 10.1038/s41576-018-0085-z
 130. **Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C. H., Ndjanga, J. B. N., Peeters, M., Hahn, B. H. & Hugenholtz, P.** 2010. Evolutionary Relationships of Wild Hominids Recapitulated by Gut Microbial Communities. *Plos Biology* 8:ARTN e1000546. **Doi:** 10.1371/journal.pbio.1000546
 131. **Oklander, L. I., Caputo, M., Fernandez, G. P., Jerusalinsky, L., de Oliveira, S. F., Bonatto, S. L. & Corach, D.** 2022. Gone With the Water: The Loss of Genetic Variability in Black and Gold Howler Monkeys (*Alouatta caraya*) Due to Dam Construction. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10. **Doi:** 10.3389/fevo.2022.768652
 132. **Oklander, L. I., Miño, C. I., Fernández, G., Caputo, M. & Corach, D.** 2017. Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. *PLOS ONE* 12:e0185867. **Doi:** 10.1371/journal.pone.0185867
 133. **Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-40. **Doi:** 10.1126/science.276.5313.734
 134. **Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A. & Parkhill, J.** 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31:3691-3693. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btv421
 135. **Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W.** 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043-55. **Doi:** 10.1101/gr.186072.114
 136. **Peixoto, R. S., Harkins, D. M. & Nelson, K. E.** 2021. Advances in Microbiome Research for Animal Health. *Annual Review of Animal Biosciences* 9:289-311. **Doi:** 10.1146/annurev-animal-091020-075907
 137. **Peters, D. L., Wang, W. J., Zhang, X., Ning, Z. B., Mayne, J. & Figeys, D.** 2019. Metaproteomic and Metabolomic Approaches for Characterizing the Gut Microbiome. *Proteomics* 19. **Doi:** 10.1002/pmic.201800363
 138. **Pham, V. T., Fehlbaum, S., Seifert, N., Richard, N., Bruins, M. J., Sybesma, W., Rehman, A. & Steinert, R. E.** 2021. Effects of colon-targeted vitamins on

- the composition and metabolic activity of the human gut microbiome- a pilot study. *Gut Microbes* 13:1-20. **Doi:** 10.1080/19490976.2021.1875774
139. **Portincasa, P., Bonfrate, L., Vacca, M., De Angelis, M., Farella, I., Lanza, E., Khalil, M., Wang, D. Q.-H., Sperandio, M. & Di Ciaula, A.** 2022. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 23:1105. **Doi:**
 140. **Possamai, C. B., de Melo, F. R., Mendes, S. L. & Strier, K. B.** 2022. Demographic changes in an Atlantic Forest primate community following a yellow fever outbreak. *American Journal of Primatology*. **Doi:** 10.1002/ajp.23425
 141. **Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. & Segata, N.** 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology* 35:833-844. **Doi:** 10.1038/nbt.3935
 142. **Quiroga-González, C., Cardenas, L. A. C., Ramírez, M., Reyes, A., González, C. & Stevenson, P. R.** 2021. Monitoring the variation in the gut microbiota of captive woolly monkeys related to changes in diet during a reintroduction process. *Sci Rep* 11:6522. **Doi:** 10.1038/s41598-021-85990-0
 143. **Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S. & Perkins, D. L.** 2016. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469:967-977. **Doi:** 10.1016/j.bbrc.2015.12.083
 144. **Reuter, J. A., Spacek, D. V. & Snyder, M. P.** 2015. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 58:586-97. **Doi:** 10.1016/j.molcel.2015.05.004
 145. **Richter, M. & Rosselló-Móra, R.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126-31. **Doi:** 10.1073/pnas.0906412106
 146. **Romanenko, L. A., Tanaka, N., Frolova, G. M. & Mikhailov, V. V.** 2008. *Pseudochrobactrum glaciei* sp. nov., isolated from sea ice collected from Peter the Great Bay of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2454-8. **Doi:** 10.1099/ijs.0.65828-0
 147. **Rosenberg, E.** 2021. *Microbiomes - Current Knowledge and Unanswered Questions*. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland.
 148. **Rylands, A. B.** 2000. An assessment of the diversity of New World primates. *Neotropical Primates* 8:61-83. **Doi:**
 149. **Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H. & Vinderola, G.** 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18:649-667. **Doi:** 10.1038/s41575-021-00440-6
 150. **Schlaeppli, K. & Bulgarelli, D.** 2015. The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:212-217. **Doi:** 10.1094/Mpmi-10-14-0334-Fi
 151. **Schloissnig, S., Arumugam, M., Sunagawa, S., Mitreva, M., Tap, J., Zhu, A., Waller, A., Mende, D. R., Kultima, J. R., Martin, J., Kota, K., Sunyaev, S. R., Weinstock, G. M. & Bork, P.** 2013. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* 493:45-50. **Doi:** 10.1038/nature11711
 152. **Schloss, P. D.** 2021. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere* 6:e00191-21. **Doi:** doi:10.1128/mSphere.00191-21
 153. **Schloss, P. D. & Westcott, S. L.** 2011. Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence

- Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77:3219-3226. **Doi:** 10.1128/Aem.02810-10
154. **Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Horn, D. J. V. & Weber, C. F.** 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7537-7541. **Doi:** doi:10.1128/AEM.01541-09
 155. **Schwab, C., Cristescu, B., Boyce, M. S., Stenhouse, G. B. & Gänzle, M.** 2009. Bacterial populations and metabolites in the feces of free roaming and captive grizzly bears. *Can J Microbiol* 55:1335-46. **Doi:** 10.1139/w09-083
 156. **Schwab, C. & Gänzle, M.** 2011. Comparative analysis of fecal microbiota and intestinal microbial metabolic activity in captive polar bears. *Can J Microbiol* 57:177-85. **Doi:** 10.1139/w10-113
 157. **Seemann, T.** 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068-9. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btu153
 158. **Segata, N.** 2015. Gut Microbiome: Westernization and the Disappearance of Intestinal Diversity. *Current Biology* 25:R611-R613. **Doi:** 10.1016/j.cub.2015.05.040
 159. **Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, P. C. & Mazmanian, S. K.** 2014. Specialized Metabolites from the Microbiome in Health and Disease. *Cell Metabolism* 20:719-730. **Doi:** 10.1016/j.cmet.2014.10.016
 160. **SiBBR.** 2022. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, Brasil.
 161. **Spor, A., Koren, O. & Ley, R.** 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 9:279-290. **Doi:** 10.1038/nrmicro2540
 162. **Stamatakis, A.** 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688-2690. **Doi:** 10.1093/bioinformatics/btl446
 163. **Stumpf, R. M., Gomez, A., Amato, K. R., Yeoman, C. J., Polk, J. D., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. & Leigh, S. R.** 2016. Microbiomes, metagenomics, and primate conservation: New strategies, tools, and applications. *Biological Conservation* 199:56-66. **Doi:** 10.1016/j.biocon.2016.03.035
 164. **Su, C., Zuo, R. J., Liu, W. W., Sun, Y., Li, Z., Jin, X. L., Jia, K. S., Yang, Y. & Zhang, H. J.** 2016. Fecal Bacterial Composition of Sichuan Snub-Nosed Monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *International Journal of Primatology* 37:518-533. **Doi:** 10.1007/s10764-016-9918-9
 165. **Sultan, S., El-Mowafy, M., Elgaml, A., Ahmed, T. A. E., Hassan, H. & Mottawea, W.** 2021. Metabolic Influences of Gut Microbiota Dysbiosis on Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Physiology* 12. **Doi:** 10.3389/fphys.2021.715506
 166. **Syrokou, M. K., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., Bosnea, L. & Mataragas, M.** 2022. A Comparative Genomic and Safety Assessment of Six *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* Strains Isolated from Spontaneously Fermented Greek Wheat Sourdoughs for Potential Biotechnological Application. *International Journal of Molecular Sciences* 23:2487. **Doi:**
 167. **Taneja, V.** 2017. Microbiome: Impact of Gender on Function & Characteristics of Gut Microbiome, p. 569-583. *In* M. J. Legato (ed.), *Principles of Gender-Specific*

- Medicine (Third Edition). Academic Press, San Diego. **Doi:**10.1016/B978-0-12-803506-1.00027-9
168. **Tang, Q., Jin, G., Wang, G., Liu, T., Liu, X., Wang, B. & Cao, H.** 2020. Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. **Doi:** 10.3389/fcimb.2020.00151
 169. **Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V.** 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28:33-6. **Doi:** 10.1093/nar/28.1.33
 170. **Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J. *et al.*** 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551:457-+. **Doi:** 10.1038/nature24621
 171. **Torres-Maravilla, E., Reyes-Pavón, D., Benítez-Cabello, A., González-Vázquez, R., Ramírez-Chamorro, L. M., Langella, P. & Bermúdez-Humarán, L. G.** 2022. Strategies for the Identification and Assessment of Bacterial Strains with Specific Probiotic Traits. *Microorganisms* 10:1389. **Doi:** 10.3390/micro10091389
 172. **Tringe, S. G. & Hugenholtz, P.** 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11:442-446. **Doi:** 10.1016/j.mib.2008.09.011
 173. **Tsuchida, S., Kitahara, M., Nguema, P. P. M., Norimitsu, S., Fujita, S., Yamagiwa, J., Ngomanda, A., Ohkuma, M. & Ushida, K.** 2014. *Lactobacillus gorillae* sp. nov., isolated from the faeces of captive and wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:4001-4006. **Doi:** <https://doi.org/10.1099/ijs.0.068429-0>
 174. **Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S. & Banfield, J. F.** 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43. **Doi:** 10.1038/nature02340
 175. **Utzschneider, K. M., Kratz, M., Damman, C. J. & Hullar, M.** 2016. Mechanisms Linking the Gut Microbiome and Glucose Metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101:2622-2622. **Doi:** 10.1210/jc.2015-4251
 176. **Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. & Wade, W. G.** 2010. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309:1-7. **Doi:** 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x
 177. **Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D. *et al.*** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66-74. **Doi:** 10.1126/science.1093857
 178. **Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R.** 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261-7. **Doi:** 10.1128/aem.00062-07
 179. **Wang, Y., Liang, Q., Lu, B., Shen, H., Liu, S., Shi, Y., Leptihn, S., Li, H., Wei, J., Liu, C., Xiao, H., Zheng, X., Liu, C. & Chen, H.** 2021. Whole-genome analysis of probiotic product isolates reveals the presence of genes related to antimicrobial resistance, virulence factors, and toxic metabolites, posing potential health risks. *BMC Genomics* 22:210. **Doi:** 10.1186/s12864-021-07539-9
 180. **Wasimuddin, Menke, S., Melzheimer, J., Thalwitzer, S., Heinrich, S., Wachter, B. & Sommer, S.** 2017. Gut microbiomes of free-ranging and captive Namibian

- cheetahs: Diversity, putative functions and occurrence of potential pathogens. *Molecular Ecology* 26:5515-5527. **Doi:** 10.1111/mec.14278
181. **Weisenfeld, N. I., Yin, S., Sharpe, T., Lau, B., Hegarty, R., Holmes, L., Sogoloff, B., Tabbaa, D., Williams, L., Russ, C., Nusbaum, C., Lander, E. S., MacCallum, I. & Jaffe, D. B.** 2014. Comprehensive variation discovery in single human genomes. *Nat Genet* 46:1350-5. **Doi:** 10.1038/ng.3121
 182. **Wences, A. H. & Schatz, M. C.** 2015. Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. *Genome Biology* 16:207. **Doi:** 10.1186/s13059-015-0764-4
 183. **Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G. & Burton, J. P.** 2015. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nature Reviews Urology* 12:81-90. **Doi:** 10.1038/nrurol.2014.361
 184. **Wilson, D. E. & Reeder, D. A. M.** 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press.
 185. **Xia, W. C., Liu, G. Q., Wang, D. L., Chen, H., Zhu, L. F. & Li, D. Y.** 2022. Functional convergence of Yunnan snub-nosed monkey and bamboo-eating panda gut microbiomes revealing the driving by dietary flexibility on mammal gut microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 20:685-699. **Doi:** 10.1016/j.csbj.2022.01.011
 186. **Xie, F., Jin, W., Si, H. Z., Yuan, Y., Tao, Y. et al.** 2021. An integrated gene catalog and over 10,000 metagenome-assembled genomes from the gastrointestinal microbiome of ruminants. *Microbiome* 9. **Doi:** 10.1186/s40168-021-01078-x
 187. **Yan, Y. Y., Li, H., Fayyaz, A. & Gai, Y. P.** 2022. Metagenomic and network analysis revealed wide distribution of antibiotic resistance genes in monkey gut microbiota. *Microbiological Research* 254. **Doi:** 10.1016/j.micres.2021.126895
 188. **Yang, C., Chowdhury, D., Zhang, Z. M., Cheung, W. K., Lu, A. P., Bian, Z. X. & Zhang, L.** 2021. A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19:6301-6314. **Doi:** 10.1016/j.csbj.2021.11.028
 189. **Yao, L., Li, X., Zhou, Z., Shi, D., Li, Z., Li, S., Yao, H., Yang, J., Yu, H. & Xiao, Y.** 2021. Age-Based Variations in the Gut Microbiome of the Shennongjia (Hubei) Golden Snub-Nosed Monkey (*Rhinopithecus roxellana hubeiensis*). *Biomed Res Int* 2021:6667715. **Doi:** 10.1155/2021/6667715
 190. **Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R. & Rossello-Mora, R.** 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12:635-645. **Doi:** 10.1038/nrmicro3330
 191. **Yildirim, S., Yeoman, C. J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B. A., Goldberg, T. L., Stumpf, R. M., Leigh, S. R., White, B. A. & Nelson, K. E.** 2010. Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities. *PLoS One* 5:e13963. **Doi:** 10.1371/journal.pone.0013963
 192. **Youngblut, N. D., De la Cuesta-Zuluaga, J., Reischer, G. H., Dauser, S., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., Farnleitner, A. H. & Ley, R. E.** 2020. Large-Scale Metagenome Assembly Reveals Novel Animal-Associated Microbial Genomes, Biosynthetic Gene Clusters, and Other Genetic Diversity. *Msystems* 5. **Doi:** 10.1128/mSystems.01045-20
 193. **Zhang, L. & Xu, Z.** 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments* 8:379-388. **Doi:** 10.1007/s11368-008-0043-z

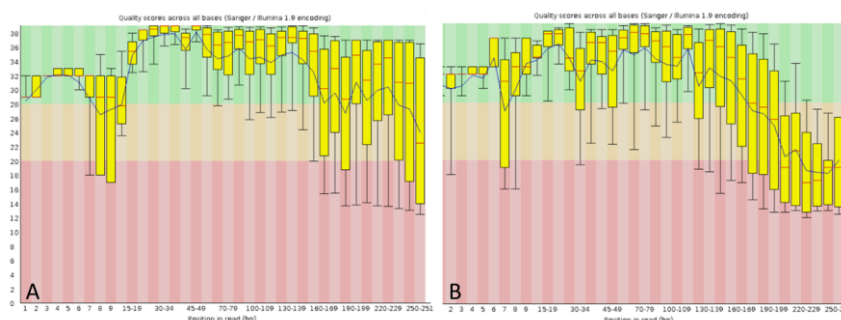
194. **Zhu, L. F., Wang, J. J. & Bahrndorff, S.** 2021. Editorial: The Wildlife Gut Microbiome and Its Implication for Conservation Biology. *Frontiers in Microbiology* 12. **Doi:** 10.3389/fmicb.2021.697499

ANEXOS

Anexo 1: Informações de coleta das 25 amostras

| ID | data_de_coleta | coleta | indivíduo | sexo | espécie | nome_popular | habitat |
|--------|----------------|--------|-----------|-------|-----------------------------------|---------------------|------------|
| C.1.1 | 23/09/2013 | 1 | Edson | macho | <i>Alouatta caraya</i> | bugio-preto-e-ruivo | cativeiro |
| C.1.2 | 23/09/2013 | 1 | Buba | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| C.1.3 | 23/09/2013 | 1 | Babi | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| NC.1.1 | 23/09/2013 | 1 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.1.2 | 23/09/2013 | 1 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.1.3 | 23/09/2013 | 1 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| C.2.1 | 25/04/2014 | 2 | Edson | macho | <i>Alouatta caraya</i> | bugio-preto-e-ruivo | cativeiro |
| C.2.2 | 25/04/2014 | 2 | Buba | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| C.2.3 | 25/04/2014 | 2 | Babi | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| NC.2.1 | 25/04/2014 | 2 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.2.2 | 25/04/2014 | 2 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| C.3.1 | 02/12/2015 | 3 | Edson | macho | <i>Alouatta caraya</i> | bugio-preto-e-ruivo | cativeiro |
| C.3.2 | 02/12/2015 | 3 | Buba | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| C.3.4 | 02/12/2015 | 3 | Pedrinho | macho | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| NC.3.1 | 02/12/2015 | 3 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.3.2 | 02/12/2015 | 3 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.3.3 | 02/12/2015 | 3 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| C.4.1 | 12/08/2016 | 4 | Edson | macho | <i>Alouatta caraya</i> | bugio-preto-e-ruivo | cativeiro |
| C.4.2 | 12/08/2016 | 4 | Buba | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| C.4.4 | 12/08/2016 | 4 | Pedrinho | macho | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| C.4.5 | 12/08/2016 | 4 | Pandora | fêmea | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | cativeiro |
| NC.4.1 | 12/08/2016 | 4 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.4.2 | 12/08/2016 | 4 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.4.3 | 12/08/2016 | 4 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |
| NC.4.4 | 12/08/2016 | 4 | - | - | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | bugio-ruivo | vida livre |

Anexo 2: Fastqc report. Exemplo do relatório de qualidade por base em forward read (A) e reverse read (B). A amostra exemplificada é a C.1.1, mas as demais amostras da coleta 1, 2 e 3 seguiram o mesmo padrão.



Anexo 3: Análise utilizando paired-end reads (sequenciamento de amplicons(região V3-V4) do gene do rRNA 16S na plataforma Illumina/MiSeq).

| ID | Input | Filtered | Denoised | Output |
|---------------|---------|----------|----------|--------|
| C.1.1 | 27841 | 9347 | 7593 | 3087 |
| C.1.2 | 25416 | 13111 | 10973 | 5288 |
| C.1.3 | 39324 | 20699 | 17786 | 9460 |
| C.2.1 | 81077 | 25928 | 21661 | 7972 |
| C.2.2 | 46738 | 21006 | 16401 | 7180 |
| C.2.3 | 87015 | 42390 | 36179 | 18299 |
| C.3.1 | 102041 | 56496 | 50549 | 24216 |
| C.3.2 | 93686 | 48925 | 43946 | 17385 |
| C.3.4 | 128813 | 55530 | 48170 | 20615 |
| C.4.1 | 429542 | 218322 | 208840 | 64083 |
| C.4.2 | 239869 | 117875 | 112838 | 36041 |
| C.4.4 | 193618 | 84595 | 80594 | 27239 |
| C.4.5 | 275158 | 141310 | 134263 | 34820 |
| NC.1.1 | 38277 | 14104 | 12232 | 8907 |
| NC.1.2 | 46187 | 14184 | 11934 | 9317 |
| NC.1.3 | 27364 | 8115 | 6736 | 5451 |
| NC.2.1 | 51609 | 12495 | 9161 | 7164 |
| NC.2.2 | 93379 | 33174 | 27393 | 16180 |
| NC.3.1 | 54721 | 19777 | 17608 | 11006 |
| NC.3.2 | 128510 | 61036 | 55533 | 23482 |
| NC.3.3 | 106065 | 46437 | 41635 | 18208 |
| NC.4.1 | 253442 | 96355 | 93475 | 46165 |
| NC.4.2 | 218721 | 67411 | 64817 | 30622 |
| NC.4.3 | 664467 | 157097 | 150565 | 50180 |
| NC.4.4 | 463889 | 191209 | 186199 | 99223 |
| Total | 3916769 | 1576928 | 1467081 | 601590 |

Anexo 4: Índices de diversidade (Faith_PD e Observed_otus) por amostra

| ID | Faith_PD | Observed_otus |
|-----------|-----------------|----------------------|
| C.1.1 | 1.372.805 | 444 |
| C.1.2 | 1.621.876 | 496 |
| C.1.3 | 1.424.995 | 474 |
| C.2.1 | 2.112.458 | 665 |
| C.2.2 | 8.421.861 | 221 |
| C.2.3 | 1.454.797 | 463 |
| C.3.1 | 2.922.535 | 955 |
| C.3.2 | 1.541.927 | 498 |
| C.3.4 | 2.613.526 | 906 |
| C.4.1 | 1.516.985 | 578 |
| C.4.2 | 9.549.874 | 353 |
| C.4.4 | 1.251.502 | 485 |
| C.4.5 | 1.570.477 | 540 |
| NC.1.1 | 1.628.498 | 502 |
| NC.1.2 | 2.079.049 | 628 |
| NC.1.3 | 1.603.375 | 444 |
| NC.2.1 | 975.057 | 234 |
| NC.2.2 | 2.186.349 | 642 |
| NC.3.1 | 2.570.902 | 723 |
| NC.3.2 | 3.132.737 | 908 |
| NC.3.3 | 3.031.938 | 913 |
| NC.4.1 | 1.181.724 | 390 |
| NC.4.2 | 1.034.451 | 338 |
| NC.4.3 | 2.279.767 | 740 |
| NC.4.4 | 1.741.881 | 605 |