



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Instituto de Biociências

A microbiota dos bivalves: revisão bibliográfica e busca por probióticos

Beatriz Barroso Navarro

Rio de Janeiro

2023

Beatriz Barroso Navarro

A MICROBIOTA DOS BIVALVES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E BUSCA POR
PROBIÓTICOS

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Natascha Krepsky

Coorientadora: Fernanda Silva dos Santos

Rio de Janeiro

2023

N322 Navarro, Beatriz Barroso
A microbiota dos bivalves: revisão bibliográfica e
busca por probióticos / Beatriz Barroso Navarro. -- Rio de
Janeiro, 2023.

71

Orientadora: Natascha Krepsky.
Coorientadora: Fernanda Silva dos Santos.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação
em Ciências Ambientais, 2023.

1. bivalve. 2. microbiota. 3. probióticos. I. Krepsky,
Natascha, orient. II. Silva dos Santos, Fernanda,
coorient. III. Título.

Beatriz Barroso Navarro

A MICROBIOTA DOS BIVALVES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E BUSCA POR
PROBIÓTICOS

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em 06 de dezembro de 2023.

(Natascha Krepsky, Dr^a., UNIRIO)

(Raquel Neves, Dr^a., UNIRIO)

(Wanderson Carvalho, Dr., UNIRIO)

Helga Assumpção, MSc., UNIRIO)

Dedicatória

Dedico este último trabalho acadêmico da minha graduação, primeiramente, a todos os profissionais da educação que constituíram parte fundamental da minha trajetória até aqui.

Dedico também a todos os familiares e amigos que sempre me incentivaram a seguir os meus sonhos, e nunca duvidaram do meu potencial.

Dedico a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma a formar isso possível, desde os motoristas de transporte público até os profissionais que exercem funções essenciais no dia a dia de um estudante, como secretários, bibliotecários, seguranças, faxineiros, merendeiros; além de inúmeros pesquisadores e demais trabalhadores associados às agências de fomento que financiaram essa pesquisa e tantas outras. Sem o empenho de cada um de vocês, muitos sonhos não seriam realizados.

Por último, mas não menos importante, dedico este trabalho à pequena Beatriz que ainda vive em mim, que é tão curiosa e ama tanto a natureza, que decidiu quando criança que seria cientista quando crescesse. Nós conseguimos.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a todas as Deusas e Deuses, e demais forças divinas que regem o Universo, por me permitirem chegar até este momento de minha vida. Muitos foram os desafios e dificuldades, mas a minha fé em algo maior me tornou resiliente e vitoriosa.

Agradeço aos meus pais, Flávia Barroso e Wander Navarro, por estarem sempre presentes aliviando as minhas angústias e me trazendo conforto. Agradeço por sempre me encorajarem a ser a minha melhor versão a cada dia, estabelecendo um lar repleto de amor para que eu pudesse crescer segura e orgulhosa de quem eu sou.

Agradeço às minhas avós, Angela Maria Barroso e Catharina Navarro, por cuidarem de mim, por orarem por mim, e por me passarem seus exemplos de vida. Nesse sentido, agradeço a minha família; em especial ao meu irmão, Ryan Barroso, que me mostrou como é linda e desafiadora a missão de ser a irmã mais velha; a minha tia, Juliana Barroso, por ter sido o meu primeiro exemplo de cientista; ao meu padrinho, Leonardo Barroso, que sempre me incentivou a sonhar alto e a estudar muito; e a minha tia, Carla Ferreira, e ao meu tio, Wagner Navarro, por terem me ajudado diversas vezes quando precisei. Sem o apoio de todos vocês, a minha caminhada teria sido mais árdua.

Agradeço ao meu namorado, Leonardo Wennerström, que esteve ao meu lado desde o começo da minha graduação, e sempre se mostrou um porto seguro em todos os momentos em que eu passava por uma tempestade interna. Ter recebido suporte, amor e alegria durante tantos anos de cumplicidade foi fundamental para que eu tivesse mais energia para continuar.

Agradeço também aos meus sogros, Leila Sueli de Almeida e Alexandre Wennerström, por terem me acolhido em sua família me proporcionando momentos felizes e abençoados.

Agradeço a todas as minhas amigadas, sejam elas virtuais ou não, por terem estabelecido um vínculo adorável e sincero comigo. Ter a dádiva de receber amigos verdadeiros me ajudou a desacelerar quando era preciso, vivendo momentos inesquecíveis. Menção especial aos meus amigos Felipe Daniel, Ian Lucas, Carolina Moura e Luciana Vidal.

Agradeço a todos os professores que realmente se dedicam ao magistério e fizeram parte do meu ensino, em especial àqueles que mais me transformaram durante a graduação: Silvia Nascimento, Michelle Sampaio, Aline Bernardes, Samira Portugal, Daniel Fonseca, Fabiano Salgueiro, Elidiomar Ribeiro, Fábio Veríssimo, e Jarbas de Mesquita. O trabalho de vocês é inspirador e extremamente necessário.

Agradeço especialmente às minhas queridas e exemplares orientadoras, Natascha Krepsky e Fernanda Silva dos Santos, que me inspiraram com suas experiências e sempre me incentivaram a seguir em frente, pois confiaram no meu potencial até mesmo quando eu

duvidava de minhas capacidades. Ter tido uma orientação empática e de confiança mútua foi essencial para que tudo desse certo até aqui. Nesse sentido, agradeço também a ajuda de Luísa Pereira, que entrou para o laboratório onde desenvolvi esse trabalho para contribuir com a finalização da redação.

Agradeço aos membros da banca avaliadora da minha defesa de monografia: Raquel Neves, Wanderson Carvalho e Helga Assumpção; por disporem de seu tempo para agregar mais conhecimento e valor ao meu trabalho.

Aproveito para agradecer a todos os professores que fizeram parte das bancas avaliadoras das 21ª e 22ª Jornadas de Iniciação Científica (JIC) da UNIRIO, por adicionarem observações muito válidas para a melhoria dessa pesquisa ao longo dos anos.

Agradeço ao Governo Federal e ao Governo Estadual, sobretudo ao Ministério da Educação, por proporcionarem o meu acesso à UNIRIO através do sistema de cotas, e por facilitarem a minha locomoção até a universidade com o Passe Livre Universitário.

Agradeço à UNIRIO, por ceder espaço e condições para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço às agências de fomento que apoiaram essa e demais pesquisas atreladas ao Laboratório de Microbiologia das Águas (LACQUA), sendo elas: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

“Eu vi um anjo no mármore e esculpi até libertá-lo.”

– Michelangelo.

Resumo

Os bivalves são moluscos aquáticos que se alimentam através da filtração; por esse motivo, podem acumular em seus tecidos diversas bactérias e contaminantes ambientais – podendo representar riscos à saúde pública, uma vez que o grupo compreende várias espécies comestíveis. Microrganismos associados aos tecidos de um hospedeiro constituem sua microbiota, que pode ser alterada por fatores bióticos ou abióticos. O estudo dessas relações proporciona a descoberta de probióticos: microrganismos *in vivo* que atuam na proteção do hospedeiro. Sendo assim, o principal objetivo desta revisão foi investigar a composição da microbiota dos bivalves e como ela responde às interações com patógenos, contaminantes, temperatura, pH, e dieta utilizada nos cultivos; indicando possíveis probióticos para o manejo desses animais. Para isso, foram levantados dados bibliográficos sobre a microbiota dos bivalves de 48 artigos científicos encontrados nas bases *PubMed* e *Web of Science*, com recorte temporal de 2010 a 2021. Os resultados gerais apontam a predominância de estudos utilizando os gêneros de bivalves *Crassostrea spp.* e *Mytilus spp.*, sendo os tecidos mais analisados o intestino, as glândulas digestivas e as brânquias; além da hemolinfa. Os filos mais representativos na microbiota dos bivalves foram *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Tenericutes*. Os patógenos de bivalves mais encontrados pertencem aos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Arcobacter*. Os fatores bióticos e abióticos avaliados interferiram na dinâmica da microbiota de bivalves, sobretudo em condições de desequilíbrio ambiental. Foi possível concluir que a microbiota é uma interface apropriada para a busca de probióticos, que constituem a base de biotecnologias. Nesse sentido, destacam-se nesta revisão como potenciais probióticos para o manejo de bivalves as bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Endozoicomonas* e *Phaeobacter*.

Palavras-chave: bivalve, marisco, mexilhão, probióticos, microbiota, microbioma.

Abstract

Bivalves are aquatic molluscs that feed through filtration; for this reason, they can accumulate a variety of bacteria and environmental contaminants in their tissues – potentially representing risks to public health, since the group includes several edible species. Microorganisms associated with the tissues of a host constitute its microbiota, which can be altered by biotic or abiotic factors. The study of these relationships has led to the discovery of probiotics: *in vivo* microorganisms that act to protect the host. Therefore, the main objective of this review was to investigate the composition of the bivalve microbiota and how it responds to interactions with pathogens, contaminants, temperature, pH, and the diet used in farming; indicating potential probiotics for the management of these animals. To this purpose, bibliographic data on the microbiota of bivalves was collected from 48 scientific articles found in the PubMed and Web of Science databases, ranging from 2010 to 2021. The general results point to the predominance of studies using the bivalve genera *Crassostrea sp.* and *Mytilus sp.*, with the most analyzed tissues being the intestine, digestive glands and gills, as well as the hemolymph. The most representative phyla in the bivalve microbiota were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Tenericutes*. The most common shellfish pathogens belonged to *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* genders. The biotic and abiotic factors evaluated interfered in the dynamic of the bivalve microbiota, especially in conditions of environmental disturbance. It was possible to conclude that the microbiota is an appropriate interface for the search of probiotics, which form the basis of biotechnologies. In this sense, this review highlights bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Endozoicomonas* and *Phaeobacter*, as potential probiotics for shellfish management.

Keywords: *bivalve, shellfish, mussel, probiotics, microbiota, microbiome.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
3. METODOLOGIA	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO.....	18
5.1 Microbiota de bivalves em geral	18
5.2 Fatores bióticos	38
5.2.1 Patógenos.....	38
5.2.2 Dieta	45
5.3 Fatores abióticos	47
5.3.1 Temperatura e pH.....	47
5.3.2 Contaminantes ambientais.....	52
5.4 Fatores concomitantes	54
5.5 Possíveis aplicações biotecnológicas da microbiota: probióticos.....	58
6. CONCLUSÃO	64

1. INTRODUÇÃO

Analisar as interações entre seres vivos e os microrganismos associados aos seus tecidos, isto é, sua microbiota, é fundamental para compreender a biologia e o desenvolvimento das espécies (McFall-Ngai et al., 2013). De acordo com Singh et al. (2013), a associação simbiótica entre os seres vivos e os microrganismos constitui a base da teoria hologenômica, proposta por Zilber-Rosenberg e Rosenberg (ano). Os autores consideram essa associação como unidade primária na seleção natural. A união entre o hospedeiro e seus simbioses é chamada holobionte. Essa união pode influenciar aspectos gênicos, uma vez que a diversidade de simbioses confere ao seu hospedeiro maior adaptabilidade às mudanças ambientais, garantindo sua sobrevivência.

Segundo a teoria hologenômica, a microbiota associada ao hospedeiro influencia na sua sobrevivência e vice-versa. Assim, quanto mais diversa a microbiota, é mais provável que o hospedeiro esteja apto para responder às condições ambientais e se defender contra patógenos. A associação com microrganismos confere ao hospedeiro proteção contra patógenos e melhoramento de funções vitais – como a digestão, com o fornecimento de nutrientes essenciais facilitado por parte da microbiota intestinal, que libera enzimas para digerir alimentos; enquanto a microbiota se beneficia do hospedeiro recebendo nutrientes e abrigo (McFall-Ngai et al., 2013).

A microbiota interfere não somente no sistema digestivo do hospedeiro, como também interfere em seu sistema imune (Singh et al., 2013). Em alguns casos, pode até mesmo estimular a ação de células de defesa, combatendo os patógenos e impedindo sua proliferação. Algo similar também pode ocorrer para inibir o efeito de toxinas. A microbiota residente também compete com microrganismos patogênicos ou oportunistas, impedindo seu estabelecimento. Em compensação, o hospedeiro oferece abrigo aos seus simbioses e condições ideais para que sobrevivam, favorecendo sua reprodução.

Tendo em vista o papel da microbiota na proteção do hospedeiro, ela pode ser fonte de probióticos. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), probióticos são microrganismos vivos administrados via oral, que atuam no equilíbrio da microbiota intestinal e favorecem a imunidade do hospedeiro, auxiliando no combate aos patógenos e infecções (Singh et al., 2013; Akhter et al., 2015). Tais microrganismos contribuem para a saúde humana e animal ao interferirem positivamente na manutenção da microbiota normal, no metabolismo, na assimilação de nutrientes ingeridos durante a alimentação, e na imunidade do hospedeiro (Prado; Romalde; Barja et al., 2010; Singh et al., 2013; Akhter et al., 2015). São exemplos de probióticos para bivalves algumas bactérias pertencentes à família *Bacillus*, que combatem ao patógeno *Vibrio harveyi* (Akhter et al., 2015; Fdhila et al., 2017).

Apesar de também oferecerem efeitos imunomoduladores, os prebióticos se diferem dos probióticos por serem fibras não digeríveis formadas por carboidratos, presentes nos ingredientes da alimentação. Podem ser classificados de acordo com o tamanho molecular ou grau de polimerização em monossacarídeos, polissacarídeos ou oligossacarídeos (Akhter et al., 2015). Os prebióticos interagem com a microbiota intestinal através da fermentação, que estimula o crescimento das colônias de microrganismos específicos, capazes de eliminar os patógenos por competição na superfície das células epiteliais. Também são capazes de melhorar a imunidade inata através de efeitos sobre a fagocitose ou macrófagos, além da ativação de neutrófilos e aumento da atividade da lisozima (Kyu-Song et al., 2014). São exemplos de prebióticos os imunossacarídeos fruto-oligossacarídeo, mananoligossacarídeo, inulina e β -glucana (Akhter et al., 2015; Kyu-Song et al., 2014). Apesar dos efeitos imunológicos do uso de prebióticos ser bastante conhecido nos animais terrestres, seu uso na aquicultura ainda é pouco explorado (Akhter et al., 2015).

Já a aplicação de probióticos na aquicultura de peixes, camarões e moluscos é um processo conhecido. Os resultados são favoráveis por demonstrarem um aumento na taxa de sobrevivência de espécies de moluscos bivalves na fase larval e juvenil; além do aumento da eficiência alimentar e das respostas imunes, contribuindo com a diminuição da mortalidade causada por doenças infecciosas (Campa-Córdova et al., 2011; Fdhila et al., 2017; Sánchez-Ortiz et al., 2016). Ademais, a aplicação de probióticos na água de cultivo ou em conjunto com a alimentação reduz a necessidade do uso de antibióticos e outras substâncias químicas imunostimulantes, que aplicados de forma excessiva estimulam a resistência dos patógenos e enfraquecem a microbiota das espécies em cultivo, diminuindo sua imunidade e afetando o seu metabolismo (Sánchez-Ortiz et al., 2016; Akhter et al., 2015).

Bivalves são animais de corpo mole, achatados, envoltos por duas conchas resistentes para proteger o manto, onde estão os seus órgãos internos. Pertencem à classe *Bivalvia* do filo *Mollusca*, com aproximadamente 9.200 espécies (Gosling, 2015). A classe *Bivalvia* é composta por mexilhões, ostras, vieiras e amêijoas. Os bivalves podem viver em ambientes marinhos, onde mais de 80% das espécies conhecidas estão; e também podem viver em ambientes dulcícolas ou estuarinos. São bentônicos e, em sua maioria, sésseis, como as ostras e os mexilhões (Gosling, 2015; Vaughn & Hoellein, 2018).

A maioria dos bivalves se alimenta por filtração, ingerindo partículas de alimentos presentes na coluna d'água ou no substrato através de suas brânquias modificadas. Tendo em vista que, para cada mililitro de água do mar exista uma densidade estimada de 10^6 bactérias e 10^9 vírus, os bivalves podem acumular em seus tecidos – sobretudo em sua cavidade gastrointestinal – uma enorme concentração de microrganismos, além de outras substâncias que porventura estejam presentes na coluna d'água (Zanella et al., 2017; Gosling,

2015). A bioacumulação nesses animais é preocupante, tendo em vista que os corpos d'água são o destino de alta carga de poluentes e contaminantes ambientais (Shuval et al., 2003; Silva dos Santos et al., 2018). A presença de tais substâncias favorece o aparecimento de patógenos oportunistas e o afloramento de microalgas e cianobactérias, que podem produzir toxinas. Em virtude dessas condições, os animais de ecossistemas aquáticos precisam contar com um sistema imune bastante eficiente (Vaughn & Hoellein, 2018). Sua microbiota pode atuar conferindo-lhe proteção e aumentando a eficiência de seu sistema imune em situações de estresse (McFall-Ngai et al., 2013; Desriac et al., 2014).

Os bivalves têm enorme importância econômica na aquicultura e maricultura (Gosling, 2015; Olivier et al., 2020). De acordo com a “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*” (FAO, 2014), a produção mundial de moluscos em 2012, incluindo bivalves, foi de 15.171 milhões de toneladas, gerando US\$ 15.857 milhões. O uso de antibióticos nesse cultivo, além de contaminar os corpos d'água, ocasiona a diminuição da microbiota residente e favorece a resistência de microrganismos patogênicos, inclusive para o ser humano – sobretudo os oportunistas, que se proliferam em condições ambientais adversas (Yeh et al., 2020; Griffin et al., 2021a; Li et al., 2019a e 2019b). Sendo assim, a acumulação nos tecidos de bivalves representa riscos à saúde pública, devido à ingestão de animais contaminados (Gosling, 2015; Horodesky et al., 2020; Silva dos Santos et al., 2018).

Os bivalves também desempenham diversos serviços ecossistêmicos nos ambientes aquáticos (Gosling, 2015; Olivier et al., 2020; Murphy et al., 2019). Esses animais agem como “biofiltros”, remediando ambientes com grande carga de nutrientes e bactérias; atuam na formação e deposição de sedimentos; no fluxo hidrológico, com o aumento da rugosidade do fundo do mar; na formação de recifes, que proporcionam a sobrevivência e a reprodução de outras espécies por criarem mais habitats e nichos ecológicos; e auxiliam na diminuição da erosão da linha costeira (Gosling, 2015; Olivier et al., 2020).

As mudanças climáticas, a preocupação com a saúde pública, e a necessidade de mitigar os efeitos da degradação ambiental, nos guiam à necessidade de encontrar soluções ecologicamente corretas e acessíveis. Com a elevação da temperatura dos mares, por exemplo, a distribuição de bactérias como *Vibrio* spp., que podem ser patogênicas tanto para os bivalves como para o ser humano, tende a aumentar (Vezzulli et al., 2011). Nesse cenário surgem os probióticos: microrganismos administrados *in vivo* às aquiculturas, que beneficiam a microbiota dos cultivos ao produzirem substâncias antimicrobianas, excluírem patógenos por competição, e induzirem a ativação de respostas imunes (Yeh et al., 2020; Campa Córdova et al., 2011).

Em virtude da importância ambiental dos bivalves e sua utilização para fins econômicos e alimentícios, esta revisão teve como principal objetivo analisar a microbiota

associada a esses organismos com os fatores bióticos e/ou abióticos responsáveis por alterá-la, visando à descoberta de potenciais probióticos. A presente abordagem é fundamental para elencar bactérias com possível papel protetor, que podem ser utilizadas como probióticos no cultivo ou no manejo de bivalves; bem como para aumentar a eficiência de filtração desses animais quando aplicados em técnicas de biorremediação. Devido aos probióticos estimularem o sistema imune sem favorecer a resistência de patógenos, ou alterar a qualidade da água pela liberação de substâncias potencialmente nocivas – como fazem os antibióticos –, eles se apresentam como uma alternativa sustentável e acessível, que deve ser explorada e amplamente utilizada.

2. OBJETIVOS

Esta revisão sistemática teve como objetivo principal definir o estado da arte de estudos sobre a microbiota associada aos bivalves, a fim de elencar bactérias benéficas encontradas naturalmente nos tecidos de mexilhões, ostras, vieiras e amêijoas, que possam servir de apoio biotecnológico ao uso como probióticos na aquicultura.

Para isso, foram listadas as principais espécies de bivalves utilizadas em estudos; os principais microrganismos identificados na microbiota de bivalves ao nível de filo, família ou gênero; e os principais patógenos de bivalves encontrados em sua microbiota. Foi traçado um paralelo entre as alterações na composição da microbiota de bivalves e a ocorrência de estressores ambientais, para que ao final fosse possível elencar bactérias benéficas presentes em sua microbiota (potenciais probióticos) que podem ser utilizadas para favorecer a imunologia de bivalves durante o manejo de suas espécies.

3. METODOLOGIA

Foram utilizados os repositórios *PubMed* e *Web of Science* para fins de pesquisa. Neles, as palavras-chave “*bivalve*”, “*shellfish*”, “*mussel*”, “*probiotics*”, “*microbiota*” e “*microbiome*” foram combinadas da seguinte maneira: estrutura principal + palavra secundária. A estrutura principal era formada por “*bivalve OR shellfish OR mussel AND*”, e a palavra secundária era constituída pelas demais palavras-chave supracitadas, adicionadas separadamente para obter resultados diferentes a cada combinação feita.

A busca foi limitada aos termos no Título/Resumo. O recorte temporal de 12 anos foi adotado, englobando artigos de 2010 a 2021. Todos os resultados apresentados pela busca foram analisados, de modo a cumprir com os objetivos desta revisão e monografia. As entradas duplicadas e revisões bibliográficas foram excluídas para considerar apenas os artigos originais.

A bibliografia foi selecionada de acordo com critérios pré-estabelecidos. Os artigos selecionados para a redação desta revisão foram cuidadosamente examinados para destacar as espécies utilizadas e outros detalhes em tabelas específicas, para facilitar a compreensão dos dados de cada tópico desenvolvido.

4. RESULTADOS

A busca por artigos que se enquadram no escopo desta revisão resultou na pré-seleção de 50 resultados no repositório *PubMed*, e 120 no repositório *Web of Science*. Após a exclusão de entradas duplicadas, restaram 93 artigos originais, dos quais 48 estavam de acordo com o objetivo proposto para esta revisão. Utilizando como critério a seleção de artigos originais que avaliaram experimentalmente a microbiota do bivalve em relação aos fatores bióticos ou abióticos que a influenciam, 8 revisões foram excluídas do banco de dados utilizado. Dos 48 artigos, 15 foram utilizados para descrever a microbiota de bivalves em geral; cinco relacionaram a microbiota à patógenos; dois relacionaram à dieta; oito relacionaram ao pH e à temperatura; quatro relacionaram à contaminantes ambientais; e sete descreveram a microbiota sendo alterada por fatores concomitantes. Para descrever aplicações biotecnológicas do conhecimento sobre a microbiota de bivalves, foram utilizados 12 artigos.

A análise dos dados tabulados dos 48 artigos trouxe o seguinte panorama geral: os gêneros de bivalves marinhos mais utilizados em estudos foram *Crassostrea spp.* (n = 19) e *Mytilus spp.* (n = 19); sendo as espécies mais estudadas a ostra *Crassostrea gigas* (n = 12) e o mexilhão *Mytilus edulis* (n = 9). Ambas espécies são comestíveis e, portanto, a composição da microbiota de seus tecidos representa importância para a saúde pública e a vigilância sanitária. De todas as 30 espécies de bivalves descritas nesta revisão, somente duas (*Amblema plicata* e *Actinonaias ligamentina*) são dulcícolas. Para descrever a microbiota, os tecidos mais analisados foram hemolinfa (n = 16), intestino (n = 15), glândulas digestivas (n = 13) e brânquias (n = 10). A escolha dos tecidos amostrados foi baseada no tipo de microbiota que os autores buscavam descrever. O método mais utilizado para descrever a microbiota dos bivalves foi a observação do DNA das amostras dos tecidos, acessado através da amplificação por PCR das regiões V3-V8 do gene 16S rRNA.

Dos 11 filos mais presentes na microbiota dos bivalves, os mais frequentes foram *Proteobacteria* (n = 26), *Bacteroidetes* (n = 19) e *Tenericutes* (n = 13). Dos 51 patógenos de bivalves e de outros organismos marinhos descritos na literatura analisada, destacam-se por estudos experimentais os grupos patogênicos *Vibrio* (n = 21), *Aeromonas* (n = 11) e *Arcobacter* (n = 7). Outros estressores de microbiota observados foram temperatura, pH, e os seguintes contaminantes: corante azul, atrazina, glifosato, os metais Hg, Cu, Cr e As, e microplásticos. As principais alterações observadas na dinâmica da microbiota dos bivalves foram: mudanças na abundância de filos, famílias ou ordens; acréscimo de bactérias oportunistas relacionadas à infecção quando havia estresse ambiental; decréscimo na diversidade microbiana quando havia presença de bactérias oportunistas e/ou patogênicas; e decréscimo de bactérias nocivas quando havia testes com possíveis probióticos.

5. DISCUSSÃO

De acordo com estudos de Meisterhans et al. (2016), tendo como base a amêijoia *Ruditapes philippinarum*, analisar a microbiota de bivalves envolve um conhecimento prévio sobre a relação específica que os microrganismos estabelecem com os tecidos. Isto é: caso o pesquisador deseje conhecer a microbiota residente de uma espécie, dentro do possível, deverá selecionar no bivalve os tecidos mais internamente localizados (ex: coração), ou a hemolinfa, que é um fluido semelhante ao sangue, presente em animais invertebrados. Mas, caso o objetivo seja descrever a microbiota transitória, para fins de vigilância sanitária e saúde pública, a coleta de tecidos mais externos (ex: intestino e brânquias) se torna a abordagem desejável (Meisterhans et al., 2016).

5.1 Microbiota de bivalves em geral

Griffin, Baer e Ward (2021) estudaram a microbiota do mexilhão *Mytilus edulis* através de amostras das pseudofezes e intestino, incluindo estômago e glândula digestiva. Para isso, os autores coletaram 11 espécimes de *M. edulis* de uma população local de Long Island Sound (Connecticut nos Estados Unidos). No laboratório, os mexilhões foram aclimatados em microcosmos estéreis e individuais, contendo 1,5L de água do mar e mantidos a uma temperatura de 19°C, sem receberem alimento. Após 3h, foram coletadas 11 amostras de pseudofezes; 6h depois, os mexilhões foram dissecados e coletaram 11 amostras do intestino. O DNA das amostras foi acessado através da amplificação por PCR da região V4 do gene 16S rRNA. As análises revelaram maior diversidade nas amostras de pseudofezes, em comparação com as amostras do intestino. Isso pode ser explicado em virtude da quantidade de bactérias transitórias ingeridas pelos bivalves, que normalmente são excretadas mais rapidamente do que as bactérias residentes (Griffin; Baer; Ward, 2021).

A microbiota das pseudofezes de *M. edulis* foi dominada pelos filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Tenericutes*; e embora não tivesse um gênero dominante, era composta de 2,5% a 30% dos seguintes: *Mycoplasma*, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Halioglobus*, *Psychromonas*, *Haloferula*, *Blastopirellula* e *Algibacter* (Griffin; Baer; Ward, 2021).

Já a microbiota do intestino de *M. edulis* teve predominância de 50% a 80% do filo *Tenericutes*, persistência de *Proteobacteria*, e diminuição de *Bacteroidetes*, embora ainda presentes. *Mycoplasma* foi o gênero mais abundante na microbiota do intestino (de 50% a 95%), e os demais representaram de 10% a 35%: *Psychrilyobacter*, *Brochothrix*, *Alteromonas* e *Lutibacter*. *Mycoplasma* é o único gênero que, devido a quantidade elevada em todos os espécimes, indica fazer parte da microbiota residente de *M. edulis* (Griffin; Baer; Ward, 2021).

Em virtude dos resultados contrastantes, Griffin e colaboradores (2021) desencorajam o uso de pseudofezes para descrever a microbiota residente, embora os dejetos possam ser

utilizados para conhecer a microbiota transitória e estudar reações biogeoquímicas envolvendo os biodepósitos de bivalves. Os autores também recomendam que as pesquisas que visem a descrever a composição da microbiota residente de bivalves sejam feitas com aclimatação adequada dos espécimes, para que as pseudofezes sejam liberadas anteriormente à dissecação. Desta forma evita-se que os resultados sejam alterados, justamente por avaliar o intestino sem haver grande parte de microrganismos transitórios nele (Griffin; Baer; Ward, 2021).

Para descrever a microbiota presente no muco e nos sete tecidos da ostra *Pinctada margaritifera*, Dubé, Ky e Planes (2019) coletaram 12 espécimes de aspecto saudável na lagoa Takapoto (Arquipélago de Tuamotu, Polinésia francesa). Os pesquisadores avaliaram a composição microbiológica do muco, brânquias, gônadas, glândula do bisso, manto, músculo adutor, intestino e hemolinfa dos espécimes. A análise do DNA dos tecidos coletados foi feita através da amplificação por PCR da região V4 do gene 16S rRNA (Dubé; Ky; Planes, 2019). Os resultados indicaram a presença de 35 filós, 103 classes e 135 ordens em *P. margaritifera*. Os filós mais recorrentes em todas as 95 amostras de tecidos foram *Proteobacteria* (56.5%), *Bacteroidetes* (11.4%), *Firmicutes* (5.4%) e *Planctomycetes* (4.6%). A unidade taxonômica mais prevalente em todas as amostras foi *Spirochaetes*, com 10,2% de abundância, embora a família *Endozoicimonaceae* e o gênero *Roseivivax* tenham aparecido em 90% das amostras. Além disso, Dubé, Ky e Planes (2019) observaram diferenças significativas entre a composição do microbioma nos diferentes tecidos. A relação bactéria-tecido foi mais forte no microbioma do intestino, onde foram encontradas mais de 40% das unidades taxonômicas. No mais, tal relação representou menos de 2% do microbioma das brânquias, gônadas, hemolinfa, manto, músculo adutor e muco; e quase 10% da glândula do bisso. Os oito tecidos de *P. margaritifera* analisados por Dubé, Ky e Planes (2019) exibiram nichos específicos de bactérias, sendo as brânquias, o intestino e a glândula do bisso os tecidos de maior diferença na composição do microbioma.

O microbioma das brânquias de *P. margaritifera* era predominantemente formado por *Endozoicomonas* e *Spirochaetes*, apresentando relação específica com bactérias do gênero *Arcobacter*. Esse gênero é associado à defesa contra patógenos e aclimatação (Lokmer & Wegner, 2014), embora também tenha sido considerado um patógeno oportunista (Burioli et al., 2017). No entanto, Dubé, Ky e Planes (2019) sugerem que esse resultado indica que *P. margaritifera* é capaz de selecionar, através da filtração de suas brânquias, bactérias que contribuam para sua imunidade com a liberação de enzimas antimicrobianas.

O microbioma do muco de *P. margaritifera* teve a maior riqueza e diversidade de espécies, e foi dominado por *Flavobacteriaceae* e *Oceanospirillales*. Dubé, Ky e Planes (2019) indicam que esses clados podem estar associados ao papel do muco no fornecimento de

nutrientes, proteção contra danos físico-químicos e virulência. A composição do microbioma do muco, músculo adutor e manto foi semelhante, exceto pela diminuição de *Endozoicimonaceae* no muco, e aumento de *Corynebacterium* no manto – espécie indicada como produtora de metabólitos antibióticos.

O microbioma da hemolinfa de *P. margaritifera* exibiu baixa riqueza de bactérias, embora tenha tido alta abundância de *Spirochaetes*, *Flavobacteria*, Alfa e *Gammaproteobacteria*, e baixa abundância de patógenos marinhos conhecidos, como *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. Dubé, Ky e Planes (2019) apontam que a baixa abundância de clados patogênicos pode ser devido à presença de *Pseudoalteromonas*, *Endozoicomonas* e *Rhodobacterales*; além de microrganismos relativamente raros, mas persistentes no microbioma da hemolinfa, como *Intrasporangiaceae* e *Coriobacteriaceae*. Estes dois últimos podem ser simbioses em comensalismo ou oferecem benefícios à *P. margaritifera*, uma vez que sua presença indica resistência ao sistema imune da ostra (Dubé; Ky; Planes, 2019).

O microbioma das gônadas de espécimes de *P. margaritifera* que não exibiram mineralização (formação de pérola) está associado à família *Endozoicimonaceae*, além de bactérias específicas do tecido reprodutor, responsáveis por processos do ciclo do carbono (*Erithrobacteraceae*) ou ciclo do enxofre (*Streptococcaceae* e *Comamonadaceae*). A presença destes clados nas gônadas da ostra indica que eles possivelmente desempenham algum papel reprodutivo, embora *Streptococcaceae* e *Comamonadaceae* possam produzir compostos bioquímicos que impactam a formação de pérolas (Dubé; Ky; Planes, 2019).

O microbioma do intestino de *P. margaritifera* foi dominado por bactérias dos filos *Firmicutes* (*Peptostreptococcaceae*), *Planctomycetes* (*Pirellulaceae*) e *Tenericutes* (*Mollicutes*), relacionados à produção de aminoácidos e vitaminas, degradação de polissacarídeos e fornecimento de nutrientes (Dubé; Ky; Planes, 2019). Já o microbioma da glândula do tecido bisso, cavidade relacionada à adesão da ostra através de secreções, foi dominado por *Rhizobiales* em maior abundância, sendo as famílias *Phyllobacteriaceae* e *Hyphomicrobiaceae* específicas deste tecido; e *Bacteroidetes* (*Flavobacteriaceae*) em menor abundância (Dubé; Ky; Planes, 2019).

No mais, Dubé e colaboradores (2019) relataram a presença do gênero *Tenacibaculum* no microbioma base de *P. margaritifera*. Esse gênero está associado a eventos de mortalidade em ostras (Burioli et al., 2017), embora não tenha apresentado patogenicidade para os 12 espécimes analisados neste estudo; o que sugere que sua comensalidade se transforma em infecção quando há condições favoráveis para isso – como a presença de parasitas (Dubé; Ky; Planes, 2019; Burioli et al., 2017).

Ainda com relação ao gênero de ostra *Pinctada*, King et al. (2021) compararam a microbiota presente em diferentes tecidos da ostra *Pinctada maxima* (intestino, coração,

glândula digestiva, brânquias, hemolinfa, manto), além do interior e exterior da concha, buscando também a similaridade do gênero *Vibrio* entre os tecidos, e a semelhança de bactérias entre a microbiota da ostra e o ambiente onde foi coletada. Para isso, 13 espécimes de *P. maxima* foram coletadas em duas baías diferentes: 3 na Baía Seaflower (SF) e 10 na Baía de Wargul Wargul (WW), ambas na Austrália. Em cada local, 250 mL de água foram coletados e filtrados em membranas de celulose de 0.22 µm. Os autores não informaram sobre o estado de saúde das ostras coletadas.

Foram coletadas 106 amostras de tecidos, que tiveram seu DNA acessado através de PCR com base nas regiões V3-V4 do gene 16S rRNA (King et al., 2021). Ao todo, foram identificados 324 clados na microbiota – dos quais 16 se destacaram nos tecidos da ostra – e 24 espécies do gênero *Vibrio*. Em relação à concha interna, tecidos da ostra e água dos locais de coleta, houve mais diversidade de bactérias na concha externa. Considerando a composição da microbiota dos tecidos de *P. maxima*, não houve diferença em relação aos locais de coleta. As famílias mais presentes nos tecidos foram *Cyanobiaceae* (gênero *Synechococcus*), *Rhodobacteraceae* (gêneros *Ruegeria*, *Nautella*, *Silicimonas* e *Actibacterium* – mais presentes no interior e exterior da concha), e *Pirellulaceae* (*Planctomycete*, gênero *Blastopirellula*); enquanto nos locais de coleta a família *Cyanobiaceae* foi predominante (King et al., 2021).

Com relação a *Vibrio spp.*, sua abundância diferiu nos tecidos da ostra, mas permaneceu a mesma independentemente do local de coleta. A abundância de *Vibrio* foi maior no intestino, e diminuiu nos tecidos a seguir, nesta ordem: glândula digestiva, brânquias, hemolinfa, coração e manto. Das 24 espécies de *Vibrio* detectadas, as mais dominantes nos tecidos de *P. maxima* foram *V. campbellii* (sobretudo no intestino), *V. rotiferianus*, *V. owensii* e *V. harveyi*; enquanto as mais abundantes na água dos locais de coleta foram *V. hepatarius*, *V. diabolicus*, e *V. tubiashii*. Destas, é sabido que *V. harveyi* é patogênico para ostras, e *V. campbellii* e *V. owensii* para camarões (King et al., 2021). Não foram encontradas relações entre *Vibrio spp.* e tecidos específicos, mas vale ressaltar que as quatro espécies de *Vibrio* dominantes nos tecidos de *P. maxima* não foram encontradas no coração, brânquias ou manto dos espécimes analisados. Todas as 24 espécies de *Vibrio* eram mais abundantes no interior e exterior das conchas em relação aos tecidos (King et al., 2021).

No mais, de acordo com os resultados de King et al. (2021), os autores recomendam que a hemolinfa, os tecidos sólidos e a parte interna das conchas de *P. maxima* são locais propícios para o transporte de bactérias entre os tecidos da ostra, sendo fundamental analisar a microbiota e acompanhar suas alterações de modo a garantir a saúde dos espécimes em cultivo, prevenindo a ação de parasitas que estiverem associados à concha desses animais.

King et al. (2020) coletaram dez espécimes adultos de *C. gigas* em seis fazendas de ostras diferentes, localizadas em estuários de baixa ou alta maré ao longo da costa leste de New South Wales (Austrália). Os autores buscaram descrever a composição da microbiota associada ao manto, brânquia, músculo adutor e glândula digestiva das ostras, totalizando 240 amostras de tecidos para análise das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, com posterior PCR. Os resultados de King et al. (2020) atestaram maior diversidade de espécies nos tecidos da glândula digestiva e das brânquias, enquanto o manto apresentou menor diversidade. A influência do local de coleta sobre a estrutura da microbiota de *C. gigas* foi menor do que a influência entre o tipo de tecido, embora ambos tenham sido determinantes para a presença de gêneros específicos. Logo, as características do estuário e sua hidrodinâmica precisam ser consideradas para os resultados.

Apesar disso, *Spirochaetaceae* foi encontrada em todos os locais e amostras, seguido por *Vulcaniibacterium* e *Mycoplasma* – estes dois últimos mais abundantes em amostras da glândula digestiva, independentemente do local de coleta. Em algumas amostras das brânquias e do músculo adutor também foram identificados *Sphingosaurantiacus* e *Acidovorax*, respectivamente (King et al., 2020). Por fim, os autores recomendam que sejam feitos estudos para caracterizar a microbiota de ostras saudáveis no local onde são cultivadas, a fim de se ter uma base de comparação quando ocorrerem eventos de mortalidade ou infecções, sendo mais fácil identificar quais foram as flutuações observadas na estrutura da microbiota de ostras antes, durante, e após esses eventos (King et al., 2020).

Fernández et al. (2014) analisaram a microbiota residente de três espécies de ostras (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea sikamea*) em relação à fase pós-larva x adulta, e local de cultivo durante a produção comercial. Na incubadora, foram coletados 30 espécimes de cada espécie durante a fase pós-larva, posteriormente transportadas à dois locais de cultivo (Baía Magdalena – BM e Baía de Topolobampo – BT; ambos no México, estado Baja California Sur) para atingirem a fase adulta. Sete a doze meses depois do transporte, 30 espécimes de aspecto saudável de cada espécie foram coletados em BM e BT e levadas ao laboratório. Ao todo, foram utilizadas no estudo 90 espécimes no estágio pós-larva e, em cada local de cultivo (BM e BT), foram coletados 30 espécimes no estágio adulto de cada espécie; totalizando 270 amostras.

A microbiota de *C. corteziensis*, *C. gigas* e *C. sikamea* em seus dois estágios de vida foi analisada através do pirosequenciamento das regiões V3-V5 do gene 16S rRNA, com posterior PCR. O DNA foi obtido do tecido total na fase pós-larva, e do tecido gastrointestinal na fase adulta das ostras. Para análise, foram desconsideradas sequências relacionadas a bactérias eucariotas ou cianobactérias. As análises retornaram 98.4% filos e aproximadamente 70% gêneros de bactérias (Fernández et al., 2014).

A comparação entre bactérias encontradas nas diferentes fases de cada espécie de ostra evidenciou que a diversidade da microbiota era maior durante a fase pós-larva. Esse resultado indica que a maturidade do trato gastrointestinal é responsável por influenciar a composição da microbiota de organismos marinhos (Paillard et al., 2004; Kesarcodi-Watson et al., 2012). Fernández et al. (2014) salientam que, devido às ostras terem passado pelo processo de depuração, e o trato gastrointestinal durante a fase pós-larva ser muito pequeno, os resultados obtidos podem não ter sido tão expressivos para as espécies analisadas.

Considerando todos os estágios de vida e locais de cultivo das ostras, os resultados de Fernández et al. (2014) trouxeram 13 filos para a microbiota de *C. corteziensis*, *C. gigas* e *C. sikamea*, sendo os mais abundantes *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. No estágio pós-larva, *Proteobacteria* era 58-72% abundante. No estágio adulto das ostras de BM, esse filo era 82% (*C. corteziensis*), 86% (*C. sikamea*) e 92% (*C. gigas*) abundante. No entanto, em BT *Proteobacteria* era mais abundante em *C. corteziensis* (87%) do que em *C. sikamea* (51%). O filo *Bacteroidetes* foi mais abundante no estágio pós-larva, com 26% (*C. gigas*), 32% (*C. corteziensis*) e 37% (*C. sikamea*) de abundância; e menos de 8% de abundância nos espécimes adultos, independentemente do local de cultivo. O filo *Firmicutes* esteve presente em todos os estágios de vida de todas as espécies de ostras, mas sua abundância relativa foi inferior às abundâncias dos filos anteriores. O filo *Actinobacteria* foi praticamente detectado apenas em ostras adultas, e exibiu abundâncias diferentes em relação aos locais de cultivo (Fernández et al., 2014).

Embora as ostras tenham passado por depuração, Fernández et al. (2014) observaram a presença de bactérias patogênicas associadas a *Chlamydia* no trato gastrointestinal de ostras *C. sikamea*. A abundância desses organismos no estágio pós-larva era de 1.7%, mas aumentou para 77.2% em *C. sikamea* em BM, e 25.5% em BT. Devido a isso, Fernández et al. (2014) destacaram a importância de identificar a microbiota presente no estágio pós-larva de ostras, pois a microbiota residente pode sofrer distúrbios devido às mudanças ambientais ao instalar a ostra pós-larva no local onde se tornará adulta, e assim parasitas como *Chlamydia* ganham vantagem temporária para se proliferar e prejudicar o cultivo.

Fernández et al. (2014) encontraram 243 gêneros de bactérias presentes na microbiota das ostras, dos quais 77 possuíam abundância relativa $\geq 1\%$. Os gêneros predominantes no estágio pós-larva de todas as ostras foram *Neptuniibacter*, *Marinicella*, *Rhodovulum* e *Oceanicola*. Em todas as espécies de ostras e em ambos os locais de cultivo o filo *Proteobacteria* foi representado por *Burkholderia* e *Escherichia/Shingella*. *Vibrio* e *Pseudomonas* não eram abundantes (Fernández et al., 2014).

O filo *Bacteroidetes* foi representado principalmente pela classe *Flavobacteria*, sendo os gêneros mais abundantes na fase pós-larval: *Lewinella*, *Tenacibaculum*, *Winogradskyella* e *Gilvibacter*; apenas os gêneros *Tenacibaculum*, *Robiginitalea*, *Salinimicrobium*, *Sediminibacterium* e *Wautersiella* foram encontrados em *C. gigas* e *C. sikamea*, mas em baixa abundância (Fernández et al., 2014). Aqui, cabe destacar que o gênero *Tenacibaculum* (espécie *Tenacibaculum soleae*) foi reportado como patógeno oportunista de *C. gigas* (Burioli et al., 2017).

O filo *Actinobacteria* esteve presente em ambos os estágios de vida e em todas as espécies de ostras, independentemente do local de cultivo. Foi representado pelo gênero *Propionibacterium*, cuja abundância foi maior em adultos. Fernández et al. (2014) destacam que a presença desse gênero nas amostras se deve, provavelmente, ao manuseio humano em condições de higiene inadequadas nas instalações de cultivo.

No mais, Fernández et al. (2014) também identificaram sequências pertencendo aos filos *Firmicutes*, *Fusobacterium* e *Spirochaetes*, embora em pequena abundância e, portanto, poucos gêneros pertencentes a estes filos foram classificados. Mas houve um gênero adquirido na fase pós-larva que se tornou prevalente em todas as amostras do trato gastrointestinal de adultos, independentemente do local de cultivo: *Burkholderia* (espécie *Burkholderia cepacia*). Estudos secundários revelam que este gênero está associado à produção de metabólitos capazes de inibir patógenos como *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*, além de degradar ácidos orgânicos – sendo, portanto, um possível probiótico (Fernández et al., 2014). Em um estudo anterior, os mesmos autores apontaram a presença de mais um possível probiótico adquirido na fase pós larval e permanente na fase adulta de *C. gigas*: *Bacillus spp.* (Fernández et al., 2012). A eficácia de três cepas de *Bacillus spp.* contra *Vibrio spp.*, também utilizando a ostra *C. gigas*, já foi provada (Fdhila et al., 2017).

Griffin et al. (2021b) quiseram investigar o efeito do uso de antibióticos na diversidade e composição do microbioma intestinal de *Crassostrea virginica* e *Mytilus edulis*, acessado por PCR da região V4 do gene 16S rRNA. Para isso, 20 ostras e 18 mexilhões foram coletados e aclimatados no laboratório durante cinco e quatro dias, respectivamente. Todos receberam o mesmo tipo de microalga (não estéril) na alimentação, e houve a troca de 50% da água do mar todos os dias. Após, os espécimes foram mantidos em microcosmos individuais com uma grade no fundo para impedir o contato dos espécimes com os biodepósitos. Nessa etapa, houve troca diária de 100% da água do mar contida nos microcosmos, remoção dos biodepósitos, e alimentação por microalgas estéreis e adequadas para cada ostra e mexilhão.

Das 20 ostras coletadas por Griffin et al. (2021b), sete foram selecionadas para o grupo pré-tratamento e aclimatadas durante dois dias, enquanto as outras 13 foram aclimatadas por cinco dias no total e divididas entre grupo controle e grupo que receberia o antibiótico. As sete

ostras do grupo pré-tratamento foram sacrificadas para acessar a composição do microbioma a partir de amostras do intestino (incluindo estômago e glândula divertícula), revelando predominância das classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Chlamidiae*, *Bacilli* e *Spirochaetae*. As sete ostras do grupo controle receberam água Milli-Q e o seu microbioma revelou predominância das mesmas bactérias presentes no grupo pré-tratamento, embora *Chlamidiae* tenha diminuído em espécimes onde *Alphaproteobacteria* ou *Gammaproteobacteria* aumentaram, revelando ainda o aumento de *Bacteroidia*. Já as seis ostras do grupo antibiótico receberam uma mistura de antibióticos (30 mg de estreptomicina, 9 mg de ciprofloxacino, e 3.5 mg de cefotaxima) durante 4 dias, a cada 12h; seguidas de 24h de depuração no quinto e último dia de aclimação. Neste grupo, o microbioma foi bastante alterado em relação aos demais: houve aumento de *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* e *Bacteroidia*; diminuição de *Alphaproteobacteria*; reaparecimento de *Chlamidiae* em um espécime; desaparecimento quase por completo de *Spirochaetae*; e aumento dos gêneros *Mycoplasma* e *Tenacibaculum* (Griffin et al., 2021b).

Dos 18 mexilhões coletados e aclimatados por Griffin et al. (2021b), seis foram selecionados para o grupo pré-tratamento, enquanto os outros 12 foram divididos entre grupo controle e grupo antibiótico. Enquanto as ostras foram expostas ao antibiótico durante cinco dias, os mexilhões tiveram sua exposição aumentada para 21 dias no total (Griffin et al., 2021b).

Os seis mexilhões do grupo pré-tratamento foram submetidos aos mesmos métodos das ostras desse grupo, e seu microbioma revelou predominância das classes *Bacilli*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Verrucomicrobiae* e *Planctomycetes*, além da presença abundante de *Fusobacteriia* em um espécime deste grupo. Os seis mexilhões do grupo controle também receberam água Milli-Q, mas ao 2º dia de aclimação um espécime morreu e foi descartado do estudo. Assim sendo, os cinco mexilhões restantes deste grupo revelaram alterações na composição do microbioma intestinal, começando pelo aumento de *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*, seguida pela diminuição de *Bacilli*, *Planctomycetes* e *Fusobacteriia*, e o quase desaparecimento de *Verrucomicrobiae*, presente em apenas dois espécimes (Griffin et al., 2021b).

Os seis mexilhões do grupo antibiótico também foram submetidos à mesma dosagem recebida pelas ostras, mas durante 21 dias. As análises revelaram um aumento significativo de *Bacteroidia* em relação aos outros grupos; diminuição de *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Bacilli*; aumento de *Planctomycetes* em espécimes com diminuição de *Bacilli*; reaparecimento de *Verrucomicrobiae* (embora pouco abundante); e desaparecimento de *Fusobacteriia* em cinco dos seis espécimes. Além disso, houve aumento significativo dos gêneros *Kordia* e *Kistimonas* no grupo antibiótico (Griffin et al., 2021b).

Com base nos resultados de Griffin et al. (2021b), foi possível concluir que o microbioma intestinal de *C. virginica* e *M. edulis* pode ser efetivamente alterado através da administração de antibióticos.

Santibañés et al. (2022) quiseram investigar os efeitos do local de coleta na composição da microbiota intestinal de *Mytilus chilensis*. Para isso, foram coletados cerca de 50 espécimes de vida livre (*Wild Type* = WT) na costa de Valdivia, e cerca de 50 espécimes de uma aquicultura local (*Mussel Farm* = MF) na ilha de Chiloé, que fornece 99% da produção chilena de mexilhões (Santibáñez et al., 2022).

Para acessar a composição da microbiota de *M. chilensis*, Santibañés et al. (2022) dissecaram cinco espécimes para remover o intestino e seu conteúdo, totalizando 20 amostras congeladas separadamente para extração do DNA. A descrição da microbiota se deu através do sequenciamento *next-generation*, a partir das regiões V6-V8 do gene 16S rRNA em cinco amostras do conteúdo do intestino (três para o grupo MF e duas para o grupo WT).

Os resultados de Santibañés et al. (2022) revelaram um total de 30 filos, sendo os mais proeminentes *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Tenericures*, *Bacteroidetes* e *Cyanobacteria*; famílias *Fusobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Mycoplasmataceae* e *Flavobacteriaceae*. As classes mais abundantes em *M. chilensis* representam 80% da microbiota das amostras analisadas, sendo compostas por *Fusobacteriia*, *Gammaproteobacteria*, *Mollicutes* e *Bacteroidia*. Nos espécimes WT, a família *Fusobacteriaceae* (gênero *Psychrilyobacter*) foi mais abundante; enquanto nos espécimes MF a família *Vibrionaceae* (gênero *Vibrio*) era mais presente do que em amostras do grupo WT.

A partir de um diagrama de Venn, Santibañés et al. (2022) ilustraram a presença de 91 e 42 gêneros únicos nos grupos WT e MF, respectivamente; dos quais 36 são compartilhados entre eles, revelando o microbioma base para *M. chilensis*. Os autores observaram que a microbiota de espécimes de *M. chilensis* de vida livre apresenta maior diversidade e riqueza de espécies em comparação com a microbiota de espécimes da aquicultura, tornando possível concluir que o local de coleta afeta a microbiota residente encontrada nos espécimes (Santibáñez et al., 2022). No mais, a abundância do gênero *Vibrio* em espécimes destinadas ao consumo humano pode ser preocupante do ponto de vista da saúde pública, pois muitas bactérias patogênicas relacionadas a mortalidade de bivalves do gênero *Mytilus* (Vezzulli et al., 2017) estão presentes neste grupo, e podem se comportar como oportunistas (Destoumieux-Garzón et al., 2020; Santibáñez et al., 2022).

Mexilhões do gênero *Mytilus* hibridizam quando suas faixas de ocorrência geográfica coincidem, representando um desafio para a aquicultura (Utermann et al., 2018). Considerando isso, as espécies *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* e *M. trossulus* tiveram seu

microbioma descrito a partir de amostras do tecido total (homogenato) de 19 espécimes, coletados em uma fazenda de aquicultura na Alemanha. Os resultados das análises do gene 16S rRNA dos microrganismos cultivados em ágar revelaram a presença de 121 cepas de bactérias (94%) e fungos (6%), sendo 12 ordens de bactérias e três ordens de fungos presentes em quase todas as amostras das três espécies de *Mytilus*.

As ordens de bactérias encontradas por Utermann et al. (2018) foram *Alteromonadales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales*, *Actinomycetales*, *Oceanospirillales*, *Flavobacteriales*, *Bacillales*, *Enterobacteriales*, *Rhodobacterales*, *Rhizobiales*, *Micrococcales* e *Xanthomonadales*; sendo as mais abundantes *Alteromonadales* e *Pseudomonadales* (presentes em todas as amostras), seguidas por *Vibrionales* e *Actinomycetales* – embora este último não estivesse presente em oito espécimes. As ordens de fungos encontradas foram *Eurotiales* (ordem *Penicillium*), *Mucorales* (ordem *Umbelopsis*) e *Hypocreales* (*Fusarium* spp.), em ordem de abundância decrescente. No mais, Utermann et al. (2018) encontraram quatro genomas diferentes, indicando sinais de hibridização aparente entre as espécies.

Os resultados de Utermann et al. (2018) são apresentados na tabela 1, e reafirmam a teoria do hologenoma ao encontrarem microrganismos anteriormente descritos para o microbioma do gênero *Mytilus*, indicando que a microbiota residente é composta por bactérias capazes de interagir positivamente com o hospedeiro, oferecendo metabólitos responsáveis por auxiliar na sobrevivência do bivalve – por exemplo, aumentando sua imunidade ao oferecer defesa antimicrobiana (Desriac et al., 2014).

Musella et al. (2020) compararam a composição da microbiota de *Mytilus galloprovincialis* a nível tecidual e externo. Para isso, 25 espécimes de *M. galloprovincialis* foram coletados em uma fazenda de aquicultura ao noroeste do Mar Adriático (Itália), onde também foram coletadas amostras de água para análise microbiológica. A hemolinfa foi coletada do músculo adutor posterior, e a dissecação removeu as brânquias, glândulas digestivas, estômago e pés de cada espécime. As amostras foram homogeneizadas, e a água coletada passou por filtros de membrana (Musella et al., 2020).

Os resultados de Musella et al. (2020) estão descritos na tabela 1. Os autores revelam que os filos mais abundantes nos mexilhões foram *Proteobacteria* (44.8% - 27.2%), *Firmicutes* (18.5% - 20.2%) e *Bacteroidetes* (14.8% - 12.8%), com a presença subdominante (até 5%) de *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Tenerituces*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Chloroflexi* e *Chlamydiae*. Algumas famílias demonstraram dominância em tecidos específicos, a saber: *Ruminococcaceae* (14%) e *Lachnospiraceae* (10% - 13.2%) na glândula digestiva; *Spirochaetaceae* (2% - 26%) no pé; *Mycoplasmataceae* (15% - 18%) no estômago; *Flavobacteriaceae* (19% - 11.2%) na hemolinfa; e uma família não classificada

pertencente à ordem *Alteromonadales* (43% - 25%) e *Hahellaceae* (11% - 9.6%) dominaram as brânquias (Musella et al., 2020).

Com relação à microbiota da água do local de coleta de mexilhões, as análises de Musella et al. (2020) revelaram a dominância dos filos *Proteobacteria* (68.6% - 8.4%) e *Bacteroidetes* (14.8% - 3.2%), com a presença subdominante de *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*, com abundância média de até 5%. As famílias dominantes foram *Pseudoalteromonadaceae* (11.6% - 8.6%), *Flavobacteriaceae* (11% - 4.3%), *Vibrionaceae* (9.3% - 9.2%), *Rhodobacteraceae* (8.8% - 4%) e *Haliaceae* (6.1% - 5.9%). No entanto, na água do grupo controle, houve menor abundância de *Pseudoalteromonadaceae* (1%) e *Verrucomicrobiaceae* (0%), e maior abundância de *Haliaceae* (10.9%).

No mais, as análises estatísticas de Musella et al. (2020) revelaram que não há diferenças significativas de diversidade e riqueza de espécies entre a microbiota das amostras teciduais de *M. galloprovincialis* e da água do mar de coleta, embora diferenças possam ser percebidas à nível das famílias subdominantes. Mas foram percebidas diferenças com relação à água do grupo controle, onde houve menor abundância das famílias dominantes na água de coleta e maior presença de *Haliaceae*. Esse resultado sugere que, ao filtrar a água ao entorno para alimentação, os mexilhões também secretam microrganismos (presentes sobretudo na hemolinfa e brânquias) e retém grupos mais específicos, como o caso da família *Haliaceae* – alterando ativamente a composição da microbiota ao entorno. Em geral, a microbiota das brânquias de *M. galloprovincialis* é menos uniforme do que a microbiota da glândula digestiva e estômago. Além disso, a leitura das sequências para *Vibrionaceae* indicou 80% de semelhança com a espécie *Vibrio splendidus*, um potencial patógeno de bivalves conhecido (Musella et al., 2020).

Bivalves desempenham diversos serviços ecossistêmicos, sendo um deles o transporte de nutrientes da zona pelágica para a zona bentônica (Olivier et al., 2018). Desse modo, o destino dos seus biodepósitos é de extrema importância para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos aquáticos (Murphy et al., 2019). Murphy et al. (2019) quiseram descrever a microbiota excretada nos biodepósitos de três espécies de bivalves: amêijoia *Mercenaria mercenaria*, ostra *Crassostrea virginica*, e mexilhão *Geukensia demissa*.

Os resultados de Murphy et al. (2019) também estão descritos na tabela 1, e consideram as análises de nove amostras de biodepósitos de bivalves, que tiveram seu DNA extraído para caracterizar a composição da microbiota através de PCR, com foco no gene 16S rRNA. As análises estatísticas revelaram que havia maior riqueza de espécies na microbiota dos biodepósitos de *C. virginica* do que nos biodepósitos de *G. demissa* e *M. mercenaria*.

Considerando todas as amostras de biodepósitos, havia dominância das classes *Gammaproteobacteria* (29.3% - 37.4%), *Deltaproteobacteria* (20.6% - 27.9%), *Bacteroidia* (15.8% - 24.1%), e *Alphaproteobacteria* (7.5% - 18.2%). As ordens mais abundantes em cada bivalve foram: *Rhodobacterales*, *Alteromonadales*, *Pseudomonadales*, *Flavobacteriales* e *Chitinophagales* (amêijoia *M. mercenaria*); *Pseudomonadales*, *Flavobacteriales*, *Chromatiales*, *Bacteroidales* e *Thiohalorhabdadales* (mexilhão *G. demissa*); *Bacteroidales*, *Chromatiales*, *Flavobacteriales*, *Rhodobacteriales* e *Thiohalorhabdadales* (ostra *C. virginica*) (Murphy et al., 2019).

A diferença de composição entre os biodepósitos das espécies pode ser explicada pelas relações específicas estabelecidas nos microbiomas teciduais dos bivalves, visto que todos receberam o mesmo tipo de alimentação, não interferindo na composição dos seus biodepósitos. Assim sendo, Murphy et al. (2019) concluem que a biodeposição de bivalves pode influenciar na estrutura e nas funções da comunidade microbiana bentônica.

Pathirana et al. (2019) quiseram investigar se o método de obtenção de DNA realizado é capaz de alterar a composição do microbioma dos tecidos da ostra *Crassostrea gigas*. Para fins de comparação, Pathirana et al. (2019) empregaram diferentes métodos de extração de amostras dos tecidos (swab e extração direta) e de ácidos nucleicos (método QIAamp e método E.Z.N.A.), além da coleta de amostras em espécimes frescos ou congelados. Ao todo, 33 amostras foram processadas considerando o sequenciamento da região V1-V3 do gene 16S rRNA, com posterior PCR. As análises estatísticas revelaram que houve diferença significativa entre a microbiota da hemolinfa e glândulas digestivas comparadas com a microbiota das brânquias e músculo adutor (Pathirana et al., 2019).

Ao todo, Pathirana et al. (2019) identificaram 47 filos nas 33 amostras dos tecidos de *C. gigas*, dos quais *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* e *Bacteroidetes* eram predominantes. As famílias *Chromatiaceae* (27.4%) e *Rhodobacteraceae* (21.6%) eram mais abundantes na microbiota da hemolinfa, enquanto *Rhodobacteraceae* (28.6%) e *Rhodospirillaceae* (23.6%) dominaram o músculo adutor. As brânquias eram dominadas pela família *Brachyspiraceae* (20%), e as glândulas digestivas eram compostas principalmente por *Fusobacteriaceae* (37.8%). Especificamente, de acordo com o método E.Z.N.A (que identificou maior diversidade), o tecido da glândula digestiva era dominado por *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Tenericutes*; enquanto o tecido das brânquias era dominado por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* e *Firmicutes*.

Os resultados de Pathirana et al. (2019) também estão resumidos na tabela 1, e evidenciaram que o método de extração das amostras dos tecidos não interferiu na descrição da microbiota das brânquias; mas o método de extração de ácidos nucleicos alterou a diversidade alfa bacteriana para alguns tecidos. O método QIAamp indicou baixa presença de

filos abundantes de acordo com o método E.Z.N.A, que aponta maior diversidade bacteriana. Por esse motivo, Pathirana et al. (2019) recomendam que o segundo método seja utilizado para extrair o DNA das amostras teciduais de bivalves, e assim descrever o microbioma com mais segurança. Ademais, amostras congeladas diminuíram o rendimento do DNA bacteriano, mas não afetaram a diversidade alfa e beta, mantendo a estrutura microbiana fidedigna. Logo, congelar amostras não representa um desafio para a descrição do microbioma, mas pode proporcionar algumas dificuldades em análises moleculares (Pathirana et al., 2019).

Valenzuela et al. (2021) descreveram a composição da microbiota da glândula digestiva e intestino do mexilhão *Choromytilus chorus* em função do local de coleta, desconsiderando variáveis ambientais. Foram coletados 27 espécimes de *C. chorus* em um estuário (Nehuentue) e mais 27 em uma baía (Hueihue), ambos no Chile. Para extrair o DNA, Valenzuela et al. (2021) selecionaram amostras da glândula digestiva e do intestino de 27 espécimes, totalizando 54 extrações. A composição da microbiota dos tecidos de *C. chorus* foi descrita através de qPCR baseado na região V3-V4 do gene 16S rRNA. Os resultados dos dois tecidos foram divididos em três grupos: mexilhões do estuário; mexilhões da baía *bank* (zona de sub-litoral); e mexilhões da baía *long-line* (zona nerítica).

A microbiota de *C. chorus* do estuário foi dominada pelo filo *Tenericutes* (91.1% no intestino e 95.7% na glândula digestiva), seguida por *Proteobacteria* e *Cyanobacteria*. O filo *Tenericutes* também foi predominante nos tecidos dos espécimes das baías (14% - 78%), seguido por *Proteobacteria* (4.5% - 47.4%), *Cyanobacteria* (3.1% - 13.6%), *Bacteroidetes* (0.9% - 14.2%), *Actinobacteria* (0.3% - 14.9%) e *Planctomycetes* (0.1% - 4.6%). As análises também relevaram que a família *Mycoplasmataceae* dominou os tecidos dos espécimes do estuário (94.1% no intestino e 95.7% na glândula digestiva), sendo também predominante nos espécimes das baías, seguida por *Rhodobacteraceae* (0.1% - 11.6%) e *Flavobacteriaceae* (0.3% - 11.1%) (Valenzuela et al., 2021).

Em relação à microbiota dos tecidos dos três grupos, os resultados de Valenzuela et al. (2021) apontam: estuário com dominância de *Tenericutes* nos tecidos de *C. chorus*; baía *bank* com abundância de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Tenericutes* no intestino, contra *Tenericutes*, *Cyanobacteria* e *Proteobacteria* na glândula digestiva; e baía *long-line* com abundância de *Proteobacteria*, *Tenericutes* e *Bacteroidetes* no intestino, contra *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Tenericutes* na glândula digestiva. Em alguns grupos, foi encontrada a presença menos abundante dos filos *Planctomycetes*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Chlamydiae* e *Spirochaetes*. As análises de Valenzuela et al. (2019) sugerem que a classe *Mollicutes* (filo *Tenericutes*) seja uma espécie chave para caracterizar a microbiota dos tecidos de *C. chorus* do estuário, enquanto a ordem

Actinomycetales (filó *Actinobacteria*) é uma espécie chave para os tecidos da espécie nas localidades da baía.

Rosbach et al. (2019) descreveram o microbioma dos tecidos do sistema digestivo, brânquias e manto de *Tridacna maxima*, uma amêijoia associada aos recifes de coral. Os resultados de Rosbach et al. (2019) revelaram sequências de 9.429 unidades taxonômicas operacionais (OTUs), das quais 8.118 estavam presentes apenas em *T. maxima*; 1.311 estavam presentes na água coletada; e 170 eram compartilhadas entre ambos.

As análises estatísticas mostraram que não houve relação entre a composição do microbioma de *T. maxima* e o local do recife onde foi coletada, não havendo relação entre os recifes e os tecidos da amêijoia, também. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre a composição da comunidade bacteriana da água em relação ao microbioma presente na amêijoia, cuja composição difere significativamente em relação aos tecidos analisados, que compartilharam apenas 303 OTUs.

Rosbach et al. (2019) encontraram a predominância da família *Endozoicomonadaceae* no microbioma das amostras de *T. maxima*, mas também constituem parte abundante as famílias *Pasteurellaceae*, *Alteromonadaceae* e *Comamonadaceae*. O microbioma do manto era mais diversificado ao nível de famílias, sendo as principais *Alteromonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae* e *Pasteurellaceae*. O microbioma do sistema digestivo era predominantemente formado por *Pasteurellaceae*, *Endozoicomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Vibrionaceae* e *Rhodobacteraceae*. Já o microbioma das brânquias era dominado por *Endozoicomonadaceae*, seguido por *Comamonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Flavobacteriaceae* e *Moraxellaceae*. Com relação às amostras da água nos três locais de recife (*inshore*, *midshore* e *offshore*), a sua composição bacteriológica era formada por *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, e gêneros não classificados de *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*.

Os resultados para composição do microbioma de *T. maxima* revelaram a presença de 39 unidades taxonômicas operacionais relacionadas à família *Endozoicomonadaceae*, embora apenas três OTUs desta família tenham sido encontradas nas amostras da água. Das 39 OTUs de *Endozoicomonadaceae*, quatro estavam presentes em todos os tecidos da amêijoia, quatro existiam apenas no sistema digestivo, quatro eram exclusivas do manto, e 19 estavam associadas às brânquias, que exibiram a maior diversidade de bactérias desta família (Rosbach et al., 2019). Algumas espécies presentes no microbioma de *T. maxima* foram identificadas pelos autores como *Endozoicomonas ascidiicola*, *Endozoicomonas euniceicola*, e *Endozoicomonas acroporae*. Rosbach et al. (2019) acreditam que a presença dessa família esteja relacionada aos ciclos biogeoquímicos envolvendo o nitrogênio, embora ela também

possa apresentar alguma proteção para a saúde do bivalve hospedeiro, necessitando de mais pesquisas para confirmação.

Rubiolo et al. (2018) investigaram os efeitos de 15h de depuração na composição bacteriana do hepatopâncreas de mexilhões coletados em três locais diferentes. Apesar de não mencionar a espécie escolhida, os resultados do estudo trouxeram considerações importantes sobre o método utilizado para descontaminar bivalves destinados ao consumo humano, sobretudo aqueles localizados em áreas de ocorrência de *Escherichia coli* (Rubiolo et al., 2018).

Os espécimes de mexilhões foram coletados em três pontos de aquicultura, classificados de acordo com a concentração de *E. coli* a cada 100g de carne e líquido intravalvular (FIL): A) 230 FIL; B) 4600 FIL; C) 46.000 FIL. Os mexilhões do local A podem ser transferidos aos mercados imediatamente após a coleta, enquanto aqueles cultivados nos locais B e C necessitam passar pela depuração antes de serem transportados para o consumo, em virtude da elevada concentração de *E. coli* em seus tecidos (Rubiolo et al., 2018).

No laboratório, mexilhões mortos ou com conchas quebradas foram descartados. Cinco espécimes de cada ponto de coleta foram dissecados para extração do hepatopâncreas, congelado para posterior análise do microbioma; representando a amostra não depurada (ND) de cada ponto de coleta. Mais cinco espécimes de cada ponto de coleta foram submetidos a 15h de depuração em um tanque de água marinha desinfetada com cloro, com sistema circulatório aberto e contínuo, visando à diminuição de *E. coli* e *Salmonella*. Após o período de depuração, os espécimes foram dissecados para extração do hepatopâncreas, posteriormente congelado para análise do microbioma; representando a amostra depurada (D) de cada ponto de coleta (Rubiolo et al., 2018).

Rubiolo et al. (2018) acessaram o DNA do hepatopâncreas a partir das regiões V1-V3 do gene 16S rRNA de cada amostra, posteriormente amplificados com PCR para descrever a composição do microbioma. Os resultados das análises foram comparados estatisticamente para observar diferenças entre as amostras em relação aos locais de coleta e estados (ND ou D). Foram apresentados os resultados para três amostras ND e apenas duas amostras D, devido à baixa qualidade das sequências de DNA obtidas.

Rubiolo et al. (2018) não observaram contaminação por *Salmonella*, mas os níveis de *E. coli* diminuíram em espécimes que passaram pela depuração. Foram obtidas 318 OTUs, sendo a composição do microbioma das amostras D menos diversa, embora mais uniforme. A classificação taxonômica identificou 10 filós nas amostras D: (*Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*), além de um filo abundante que não pôde ser identificado.

O microbioma do hepatopâncreas dos bivalves ND era predominantemente formado pelos filos *Proteobacteria* (18–25%), *Tenericutes* (4–20%), *Planctomycetes* (10–22%) e *Cyanobacteria* (10–43%); mas alterações foram descritas por Rubiolo et al. (2018) para o microbioma dos espécimes depurados. Os filos *Proteobacteria* e *Planctomycetes* diminuíram em amostras D, enquanto *Tenericutes* aumentou, indicando dominância nessa condição. Não houve dominância de um filo específico em amostra ND. *Cyanobacteria* não apresentou variação significativa entre as amostras. Em amostras D, o gênero *Alphaproteobacteria* aumentou enquanto *Gammaproteobacteria* (associado aos patógenos *Pseudomonas*, *E. coli*, *Vibrio spp.* e *Salmonella*) diminuiu; *Mycoplasma* praticamente desapareceu (de 90.6% em ND a 0.9% em D), sendo substituído por um gênero do mesmo filo (*Tenericutes*) que não pôde ser identificado (Rubiolo et al., 2018). No mais, o patógeno *Rickettsiales spp.*, que apresenta risco ao consumo humano, foi detectado em amostras ND.

Sendo assim, os resultados de Rubiolo et al. (2018) confirmam que o processo de depuração é responsável por alterar a composição do microbioma de bivalves, diminuindo a diversidade e a uniformidade de bactérias associadas aos tecidos; embora o processo favoreça a diminuição de bactérias que representam riscos à saúde pública.

Os resultados discutidos até o momento se referem apenas a bivalves de água salina, pois ainda há poucos estudos caracterizando a microbiota de bivalves de ambientes dulcícolas (Vaughn & Hoellein, 2018). Sendo assim, Higgins, Parr e Vaughn (2022) se dedicaram a descrever o microbioma presente no biofilme das conchas e nos biodepósitos de *Amblema plicata* e *Actinonaias ligamentina*, duas espécies de mexilhões de água doce. Tais espécies são dominantes no Rio Kiamichi (Oklahoma), e foram escolhidas pelos autores por apresentarem comportamento diferente, sendo *Amblema plicata* normalmente sedentário, enquanto *Actinonaias ligamentina* é um escavador ativo. Ambas as espécies atuam na manutenção do ecossistema do rio, pois favorecem a ciclagem de nutrientes entre o substrato e a água, além de criar micro-nichos de ocorrência de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas (Higgins; Parr; Vaughn, 2022).

Higgins; Parr & Vaughn (2022) selecionaram três locais de coleta no Rio Kiamichi, de onde foram coletadas 12 amostras de substrato e 24 espécimes de mexilhões (12 *A. plicata* e 12 *A. ligamentina*). O microbioma das conchas foi descrito com base em 19 amostras de biofilme, e o de biodepósitos foi descrito com base em 20 amostras de pseudofezes coletadas após 4h-6h dos mexilhões imersos em um tanque contendo 1L de água do rio filtrada. O microbioma das amostras foi acessado através da amplificação da região V4 do gene 16S rRNA, com posterior análise PCR. (Higgins; Parr; Vaughn, 2022).

Nas amostras de biofilme, foram identificados 12 gêneros (*Meiothermus*, *Kouleoithrix*, *Planctomyces*, *Kaistobacter*, *Steroidobacter*, *Hyphomicrobium*, *Calothrix*, *Synechococcus*,

Dolichospermum, *Caldilinea*, *Paulinella* e *Oscillochloris*) e 19 famílias: *Sphingomonadaceae*, *Thermaceae*, *Kouleothrixaceae*, *Chitinophagaceae*, *Planctomycetaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Sinobacteraceae*, *Syntrophaceae*, *Rivulariaceae*, *Synechococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Nostocaceae*, *Caldilineaceae*, *Comamonadaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *Acetobacteraceae* e *Oscillochloridaceae* (Higgins; Parr; Vaughn, 2022).

Já nas amostras de biodepósitos foram identificados quatro gêneros (*Synechococcus*, *Desulfococcus*, *Steroidobacter* e *Dolichospermum*) e 15 famílias: *Synechococcaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Armatimonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Chitinophagaceae*, *Acetobacteraceae*, *Sinobacteraceae*, *Pirellulaceae*, *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Caldilineaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Chthoniobacteraceae* e *Nostocaceae* (Higgins; Parr; Vaughn, 2022).

Por último, nas amostras dos sedimentos foram identificados sete gêneros (*Dechloromonas*, *Synechococcus*, *Geobacter*, *Rhodobacter*, *Novosphingobium*, *Anaeromyxobacter* e *Crenothrix*) e 17 famílias: *Methanomassiliococcaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Xenococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Isosphaeraceae*, *Comamonadaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Synechococcaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Geobacteraceae*, *Cytophagaceae*, *Alcaligenaceae*, *Chitinophagaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Myxococcaceae* e *Crenotrichaceae* (Higgins; Parr; Vaughn, 2022).

Os resultados de Higgins; Parr & Vaughn (2022) evidenciaram que o microbioma das amostras de biofilme e biodepósito dos mexilhões são 44% menos ricos e 7% menos uniformes do que as amostras de substrato. Não há diferença significativa entre a composição do microbioma dos tecidos dos mexilhões, embora as amostras de biodepósitos apresentem menor uniformidade em relação às amostras de biofilme (Higgins; Parr; Vaughn, 2022). Os autores observaram que a composição do microbioma dos tecidos dos mexilhões está mais relacionada ao local de coleta do que à espécie.

Tabela 1: microbiota tecidual de espécies de bivalves discutidas neste tópico.

Bivalve spp.	Tecido	Microbiota (grupo)	Referência
<i>Actinonaias ligamentina</i>	Concha (biofilme)	(família) <i>Synechococcaceae</i> ; <i>Chitinophagaceae</i> ; <i>Hyphomicrobiaceae</i> ; <i>Sinobacteraceae</i> ; <i>Nostocaceae</i> ; <i>Caldilineaceae</i> ; <i>Acetobacteraceae</i>	Higgins; Parr; Vaughn, 2022

<i>Amblema plicata</i>	Concha (biofilme)	(família) <i>Synechococcaceae</i> ; <i>Chitinophagaceae</i> ; <i>Hyphomicrobiaceae</i> ; <i>Sinobacteraceae</i> ; <i>Nostocaceae</i> ; <i>Caldilineaceae</i> ; <i>Acetobacteraceae</i>	Higgins; Parr; Vaughn, 2022
<i>Choromytilus chorus</i>	Glândula digestiva; Intestino	(filo) <i>Tenericutes</i> ; <i>Proteobacteria</i> ; <i>Cyanobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Planctomycetes</i>	Valenzuela et al., 2021
<i>Crassostrea cortenziensis</i>	Trato gastrointestinal	(filo) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Firmicutes</i> ; <i>Fusobacterium</i> ; <i>Spirochaetes</i> ; <i>Bacillus spp.</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i>	Fernández et al., 2012 e 2014
	Trato gastrointestinal	(filo) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Firmicutes</i> ; <i>Fusobacterium</i> ; <i>Spirochaetes</i> ; <i>Bacillus spp.</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i>	Fernández et al., 2012 e 2014
<i>Crassostrea gigas</i>	Hemolinfa; Brânquias; Glândulas digestivas; Músculo adutor	(filo) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Fusobacteria</i> ; <i>Spirochaetes</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Tenericutes</i> ; <i>Firmicutes</i>	Pathirana et al., 2019
	Hemolinfa; Glândulas digestivas	(gênero) <i>Vibrio</i> ; <i>Pseudoalteromonas</i>	Vezzulli et al., 2018
	Glândulas digestivas; Manto; Brânquias	(família e gênero) <i>Spirochaetaceae</i> ; <i>Vulcaniibacterium</i> ; <i>Mycoplasma</i> ; <i>Sphingoaurantiacus</i> ; <i>Acidovorax</i>	King et al., 2020

<i>Crassostrea sikamea</i>	Trato gastrointestinal	(filo) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Firmicutes</i> ; <i>Fusobacterium</i> ; <i>Spirochaetes</i>	Fernández et al., 2014
<i>Crassostrea virginica</i>	Biodepósitos	(orden) <i>Bacteroidales</i> ; <i>Chromatiales</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Thiohalorhabdales</i>	Murphy et al., 2019
	Intestino	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Chlamidiae</i> ; <i>Bacilli</i> ; <i>Spirochaetae</i>	Griffin et al., 2021b
<i>Geukensia demissa</i>	Biodepósitos	(orden) <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Chromatiales</i> ; <i>Bacteroidales</i> ; <i>Thiohalorhabdales</i>	Murphy et al., 2019
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Biodepósitos	(orden) <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Alteromonadales</i> ; <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Chitinophagales</i>	Murphy et al., 2019
<i>Mytilus chilensis</i>	Intestino	(filo) <i>Fusobacteria</i> ; <i>Proteobacteria</i> ; <i>Tenericures</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Cyanobacteria</i>	Santibañés et al., 2022
<i>Mytilus edulis</i>	Intestino	(orden) <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Fusobacteriales</i> ; <i>Pirellulales</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Microtrichales</i>	Li et al., 2020
	Homogenato (tecidos internos)	(orden) <i>Alteromonadales</i> ; <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Vibrionales</i> ; <i>Actinomycetales</i> ; <i>Eurotiales (Penicillium)</i>	Utermann et al., 2018

	Hemolinfa; Brânquias; Glândulas digestivas; Estômago; Pé	(filó) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Firmicutes</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Spirochaetes</i> ; <i>Verrucomicrobia</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Tenericutes</i> ; <i>Planctomycetes</i>	Musella et al., 2020
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hemolinfa; Glândulas digestivas	(gênero) <i>Vibrio</i> ; <i>Pseudoalteromonas</i> ; <i>Desulfovibrio</i>	Vezzulli et al., 2018
	Homogenato (tecido total)	(ordem) <i>Alteromonadales</i> ; <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Vibrionales</i> ; <i>Actinomycetales</i> ; <i>Eurotiales (Penicillium)</i>	Utermann et al., 2018
<i>Mytilus trossulus</i>	Homogenato (tecido total)	(ordem) <i>Alteromonadales</i> ; <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Vibrionales</i> ; <i>Actinomycetales</i> ; <i>Eurotiales (Penicillium)</i>	Utermann et al., 2018
<i>Pinctada margaritifera</i>	Brânquias; Gônadas; Glândula do tecido bisso; Hemolinfa; Manto; Músculo adutor; Intestino; Muco	(filó) <i>Proteobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ; <i>Firmicutes</i> ; <i>Planctomycetes</i> ; <i>Spirochaetes</i>	Dubé; Ky; Planes, 2019
<i>Pinctada maxima</i>	Brânquias; Glândula digestiva; Manto; Hemolinfa; Intestino; Coração; Concha interna e externa	(família e spp.) <i>Cyanobiaceae</i> (<i>Synechococcus</i>); <i>Rhodobacteraceae</i> (<i>Ruegeria</i> , <i>Nautella</i> , <i>Silicimonas</i> e <i>Actibacterium</i>); <i>Pirellulaceae</i> (<i>Blastopirellula</i>)	King et al., 2020
<i>Tridacna maxima</i>	Sistema digestivo	(família) <i>Pasteurellaceae</i> ; <i>Endozoicomonadaceae</i> ; <i>Hyphomicrobiaceae</i> ; <i>Vibrionaceae</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	Rosbach et al., 2019

	(família) <i>Alteromonadaceae</i> ; <i>Comamonadaceae</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i> ; <i>Moraxellaceae</i> ; <i>Pasteurellaceae</i>
Manto	
	(família) <i>Endozoicomonadaceae</i> ; <i>Comamonadaceae</i> ; <i>Clostridiaceae</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i> ; <i>Moraxellaceae</i>
Brânquias	

5.2 Fatores bióticos

5.2.1 Patógenos

Um dos fatores que pode afetar a microbiota é a exposição a patógenos. Considerando que os bivalves se alimentam através da filtração, estes tendem a acumular em seus tecidos microrganismos nativos ou introduzidos no ambiente aquático, e que podem estabelecer relações mutualísticas ou patogênicas com o seu hospedeiro (Pierce & Ward, 2018). A maioria das infecções que atingem os bivalves são ocasionadas por bactérias do gênero *Vibrio* (Gosling, 2015). A microbiota pode atuar eliminando patógenos por competição ou sinalizando sua presença ao sistema imune (Lokmer & Wegner, 2014; McFall-Ngai et al., 2013). Este, por sua vez, coordena respostas celulares e bioquímicas criando um robusto equilíbrio entre o hospedeiro saudável e a microbiota residente (McFall-Ngai et al., 2013). Entretanto, quando ocorre o estabelecimento de uma infecção, a microbiota pode ser alterada em sua composição e diversidade (Lokmer & Wegner, 2014; McFall-Ngai et al., 2013). O desequilíbrio na microbiota, paralelamente ao estabelecimento de uma infecção, sugere uma influência recíproca entre a microbiota e o sistema imune na proteção do indivíduo contra organismos patogênicos (Lokmer & Wegner, 2014; McFall-Ngai et al., 2013).

Eventos de mortalidade em massa de *Crassostrea gigas* afetando 65% dos espécimes adultos foram relatados durante o verão na Europa, podendo ser ocasionados por bactérias do gênero *Vibrio* e *Arcobacter* (Burioli et al., 2017). Burioli et al. (2017) foram os primeiros a descrever a mortandade de *C. gigas* associada à cepa *Tenacibaculum soleae*, isolada de espécimes sintomáticas e identificada através de análise 16S rRNA como pertencente à família *Flavobacteriaceae*.

Para compreender a patogenicidade das bactérias relacionadas à mortandade de verão e sua interação com a microbiota, Burioli et al. (2017) coletaram 15 espécimes de *C. gigas* de aspecto moribundo na lagoa de San Teodoro (Itália) durante um episódio de mortalidade, e 15 espécimes de aspecto saudável em uma área aparentemente limpa da

mesma lagoa. As lesões descritas em espécimes moribundos foram manchas amarelo-esverdeadas no manto e grandes áreas de necrose liquefativa no músculo adutor, com processo inflamatório avançado devido à presença massiva de hemócitos ao redor das lesões.

Através de análises moleculares, Burioli et al. (2017) realizaram a identificação de bactérias presentes na hemolinfa dos espécimes sintomáticos e assintomáticos de *C. gigas*. Foi constatada diferença na composição bacteriana entre os grupos, com presença de *Vibrio aestuarianus* em ambos – 100% no grupo sintomático, e 20% no grupo assintomático. Nos espécimes assintomáticos, as análises evidenciaram a presença de *Vibrio spp.* (32%) com predominância de *V. splendidus* (78%); além da associação com outros gêneros, como *Pseudoalteromonas* (18%), *Arcobacter* (18%), *Shewanella* (10%) e *Psychrobacter* (8%). Já em espécimes sintomáticos, a diversidade bacteriana encontrada na hemolinfa foi menor: *Vibrio spp.* (62%), *Arcobacter* (18%), e a cepa *Tenacibaculum soleae*, pertencente à família *Flavobacteriaceae*, que estava presente em todos os espécimes que apresentaram sintomas.

A cepa *T. soleae* está relacionada ao aparecimento de úlceras e necrose nas guelras de peixes (Burioli et al., 2017). Como ela também esteve presente nos espécimes de *C. gigas* analisados no estudo de Burioli et al. (2017), os autores sugerem que, em condições propícias, esta cepa se comporta como um patógeno oportunista que agrava as infecções causadas por patógenos de bivalves – como *V. aestuarianus*. Os resultados de Burioli et al. (2017) constam na tabela 2.

A sinergia entre bactérias do gênero *Vibrio* e potenciais patógenos de bivalves também foi observada em mexilhões *Pinna nobilis* na Ilha de Limnos, Grécia (Lattos et al., 2020). Em um evento de mortandade em massa ocorrido no local em 2019, Lattos et al. (2020) realizaram análises de sequenciamento de rRNA 16S das glândulas digestivas de seis espécimes de *P. nobilis* infectados por *Mycobacterium spp.*, em uma zona também afetada pelo patógeno *Haplosporidium pinnae*. Não foram utilizados espécimes sadios na análise. Em síntese, foram encontrados os filos *Proteobacteria* (30,59%), *Tenericutes* (13,18%) e *Fusobacteria* (12,16%). Análises das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) descreveram 30 famílias de bactérias, com destaque para *Mycoplasmataceae*, *Alteromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Mycobacteriaceae*.

Lattos et al. (2020) evidenciaram a presença de três cepas patogênicas em todos os seis espécimes de *P. nobilis* analisados: *Vibrio mediterranei*, *Photobacterium sanguinicancri*, e *Aliivibrio salmonicida*. Também foram encontradas cepas pertencentes à *Pseudoalteromonas spp.* e *Psychrilyobacter spp.* Com exceção de *Psychrilyobacter spp.*, todas as outras bactérias descritas estão relacionadas às doenças de bivalves – sugerindo que bactérias patogênicas podem atuar em conjunto com parasitas de forma oportunista

durante um estresse ambiental, agravando as infecções e aumentando a mortalidade das espécies (Lattos et al., 2020). Os resultados de Lattos et al. (2020) e de outros pesquisadores estão descritos na tabela 2.

A presença de *Vibrio spp.* em ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Mytilus galloprovincialis* também foi constatada em espécimes coletados em incubadoras no Golfo de La Spezia (Itália), ainda que não tenha havido ocorrência de mortalidade em massa no período analisado (Vezzulli et al., 2017).

Através de pirosequenciamento do gene 16S rDNA, os resultados de Vezzulli et al. (2017) atestaram semelhança entre a microbiota das duas espécies, sendo a diversidade e a riqueza de bactérias presentes na hemolinfa superiores às glândulas digestivas em ambas as espécies. Há mais diversidade bacteriana na hemolinfa de *C. gigas*, embora os mesmos grupos estejam presentes na hemolinfa de *M. galloprovincialis*: *Pseudoalteromonas* (*C. gigas*: 24% e *M. galloprovincialis*: 25%) e *Vibrio* (24% em *C. gigas* e 14% em *M. galloprovincialis*). Na glândula digestiva, o gênero *Vibrio* também foi dominante em *C. gigas* (36%) em relação a *M. galloprovincialis* (28%). Através da análise PCR, patógenos de bivalves pertencentes ao clado de *Vibrio splendidus* e *Vibrio aestuarianus* foram encontrados em ambas as espécies, e não houve presença de patógenos de humanos. Vale ressaltar que em *C. gigas*, *V. aestuarianus* só foi encontrada na hemolinfa (Vezzulli et al., 2017).

Vezzulli et al. (2017) também destacaram a presença de bactérias do gênero *Desulfovibrio* (40%) unicamente em espécimes de *M. galloprovincialis*. Além disso, descreveram a diferença de composição bacteriana entre os tecidos analisados e a água, onde houve dominância do filo *Cyanobacteria* (28%) e família *Rhodospirillaceae* (14%); enquanto os filos dominantes na hemolinfa e nas glândulas digestivas dos espécimes coletados, *Pseudoalteromonas* e *Vibrio*, representavam apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes na água.

Ademais, após submetidas à depuração, foi constatada a diminuição da diversidade e da riqueza de bactérias associadas aos tecidos analisados em ambas espécies, embora tenha ocorrido: aumento na concentração dos patógenos *V. aestuarianus* e *V. splendidus* na hemolinfa (de 24% a 42% em *C. gigas*, e de 14% a 56% em *M. galloprovincialis*) e na glândula digestiva (de 28% a 54% em *M. galloprovincialis*); aumento de *Stenotrophomonas* na glândula digestiva de *C. gigas* (<1% a 23%) e *M. galloprovincialis* (<1% a 26%); diminuição de *Pseudoalteromonas* na hemolinfa de *M. galloprovincialis* (de 25% a 9%); e desaparecimento de *Escherichia coli* e do gênero *Desulfovibrio* em *M. galloprovincialis*, devido à variação na concentração de oxigênio nos tanques de depuração comercial (Vezzulli et al., 2017). Vezzulli et al. (2017) salientam que o aumento da concentração de *Vibrio spp.* após a depuração sugere que o método não é suficiente para eliminar possíveis patógenos de bivalves, pois

pode inclusive aumentar a concentração de bactérias oportunistas e agravar infecções. Os patógenos encontrados por Vezzulli et al. (2017) constam na tabela 2.

Bactérias presentes na microbiota de ostras coletadas em áreas de estuário também representam risco à saúde humana (Horodesky et al., 2020). Para chegar a esta conclusão, Horodesky et al. (2020) coletaram e analisaram espécimes de ostras *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* em sete fazendas de ostras no nordeste do Brasil – consideradas as mais representativas pelo Serviço Brasileiro de Suporte às Micro e Pequenas Companhias (SEBRAE).

Através da análise PCR por abordagem molecular do gene 16S rRNA, a microbiota das ostras foi identificada e a prevalência dos grupos entre os espécimes foi estabelecida para aqueles táxons de concentração acima de 5%. Foram identificados 106 gêneros de bactérias pertencentes a 21 filos. Destes, os filos mais prevalentes entre as amostras foram *Tenericutes* (21,7%), *Spirochaetes* (6,6%), *Cyanobacteria* (2,6%) e *Fusobacteria* (2,1%). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de bactérias prevalentes e os locais de coleta, período sazonal, ou variáveis abióticas (Horodesky et al., 2020).

O potencial patogênico para ostras e humanos dos grupos mais encontrados foi atestado através de revisão bibliográfica. Dos 106 gêneros encontrados em *C. gasar* e *C. rhizophorae*, 40 representam bactérias potencialmente patogênicas para humanos e seis são potenciais patógenos para ostras (Horodesky et al., 2020). Dos 40 gêneros potencialmente patogênicos para humanos, nove são conhecidos por causarem infecções alimentares: *Clostridium* (0,1%), *Bacillus* (0,2%), *Staphylococcus* (0,2%), *Alteromonas* (0,1%), *Pseudomonas* (0,1%), *Vibrio* (0,1%), *Sphingomonas* (0,2%), *Arcobacter* (1%) e *Flavobacterium* (0,1%). Os seis gêneros potencialmente patogênicos para ostras são representados por *Mycoplasma* (38,8%), *Photobacterium* (0,2%), *Vibrio* (0,2%), *Pseudomonas* (0,1%), *Oceanospirillum* (0,1%) e *Alteromonas* (0,1%) (Horodesky et al., 2020).

Dos nove gêneros responsáveis por causar infecções alimentares, somente um (*Staphylococcus*) é monitorado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que exige sua análise para comercialização e produção. A presença deste gênero em ostras está atrelada ao manuseio em condições de higiene inadequadas. Ademais, foi constatada que a prevalência do gênero *Mycoplasma* (variando de 4,5 a 71%) em todos os espécimes coletados representa um alerta, uma vez que o gênero está associado a patologias tanto em humanos como em ostras, e se prolifera em ambientes de alta temperatura (de 20°C a 37°C) – algo preocupante do ponto de vista das mudanças climáticas, com o conseqüente aquecimento dos oceanos. Ressaltando que as ostras coletadas por Horodesky et al. (2020) estavam em

áreas destinadas ao consumo humano, a prevalência de bactérias patogênicas atualmente não monitoradas representa sérios riscos à saúde humana.

Schill; Iwanowicz & Adams (2017) quiseram descrever a composição do microbioma presente nas brânquias e intestino do mexilhão *Mytilus edulis*, para determinar o microbioma base e prever possíveis alterações ocasionadas por patógenos ou estresse ambiental. Os resultados dos autores estão apresentados na tabela 2, e são descritos a seguir.

Schill; Iwanowicz & Adams (2017) revelaram que o microbioma intestinal de *M. edulis* é mais diverso do que o microbioma das brânquias, apresentando 178 e 68 gêneros de bactérias, respectivamente. A composição do microbioma era semelhante entre as amostras do mesmo tipo de tecidos, mas difere entre as amostras de tecidos diferentes. A composição do microbioma apresentada a seguir considerou a ocorrência dos gêneros acima de 1% em pelo menos uma amostra de cada tecido dos espécimes de *M. edulis* (Schill; Iwanowicz; Adams, 2017).

Das 1.697.852 leituras obtidas das brânquias de *M. edulis*, 95.7% - 99.5% estão representadas por 12 gêneros: *Endozoicomonas* (41.9% - 90.3%), *Kistimonas* (0.1% - 36.9%), *Pseudoalteromonas* (0.6% - 29.3%), *Lysinibacillus*, *Geminicoccus*, *Azospirillum*, *Aquimarina*, *Oceanospirillum*, *Aeromonas*, *Propionibacterium*, *Loktanella* e *Ferrimonas*. Os três primeiros gêneros são os mais abundantes entre as amostras das brânquias de *M. edulis* de ambos os locais de coleta, Barnegat e Absecon; e todos os gêneros foram identificados independentemente do local ou número da amostra (Schill; Iwanowicz; Adams, 2017).

E das 988.436 leituras obtidas do intestino de *M. edulis*, 94.5% - 98.4% correspondem a 33 gêneros: *Endozoicomonas* (4% - 71.8%), *Psychrilyobacter* (0.9% - 18.8%), *Fangia* (5.5% - 12.5%), *Mycoplasma*, *Kistimonas*, *Candidatus Megaira*, *Aquimarina*, *Vibrio*, *Rubritalea*, *Fulvivirga*, *Orientia*, *Fucophilus*, *Pirellula*, *Lutimonas*, *Maribacter*, *Sulfurospirillum*, *Tenacibaculum*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia*, *Lutibacter*, *Winogradskyella*, *Polaribacter*, *Propionigenium*, *Pleurocapsa*, *Haliea*, *Loktanella*, *Lysinibacillus*, *Blastopirellula*, *Aliivibrio*, *Pseudofulvibacter*, *Sulfurovum*, *Wenyngzhuangia* e *Pseudomonas*. Os três primeiros gêneros são os mais abundantes entre as amostras do intestino de *M. edulis*, e todos estes gêneros foram identificados independentemente do local ou número da amostra (Schill; Iwanowicz; Adams, 2017).

Ainda que indicadores fecais não tenham sido identificados nos tecidos de *M. edulis* nos resultados de Schill; Iwanowicz & Adams (2017), foram encontrados gêneros relacionados a espécies de patógenos marinhos no microbioma da espécie: *Pleurocapsa* e *Pseudoalteromonas* (patógenos de algas); *Allivibrio*, *Aeromonas*, *Aquimarina* e *Tenacibaculum* [patógenos de peixes, sendo a cepa *Tenacibaculum soleae* identificada como

patógeno de ostras *C. gigas* por Burioli et al. (2017)]; além de *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Lysinibacillus*, e *Orientia*.

A tabela 2 reúne os principais gêneros ou bactérias relatados como patógenos de bivalves, encontrados na microbiota das espécies descritas nessa revisão sem que os espécimes apresentassem sinais de doença infecciosa ou mortandade, necessariamente.

Tabela 2: principais bactérias patogênicas encontradas ou testadas em bivalves.

Patógeno (<i>spp.</i> ou gênero)	Referência	Patógeno (<i>spp.</i> ou gênero)	Referência
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Mathai et al. (2021)	<i>Photobacterium</i> *	Lokmer & Wegner (2014); Horodesky et al. (2020); Pavlinec et al. (2020)
<i>Aeromonas caviae</i>	Leite et al. (2017)	<i>Photobacterium sanguinancrri</i> *	Lattos et al. (2020)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Leite et al. (2017); Mathai et al. (2021)	<i>Pleurocapsa</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017)
<i>Aeromonas media</i>	Mathai et al. (2021)	<i>Pseudoalteromonas</i> *	Schill; Iwanowicz & Adams (2017); Offret et al. (2019); Dubé; Ky; Planes (2019); Lattos et al. (2020); Pavlinec et al. (2020)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Leite et al. (2017); Mathai et al. (2021)	<i>Pseudomonas</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017); Horodesky et al. (2020)
<i>Aeromonas schuberti</i>	Mathai et al. (2021)	<i>Psychrobacter</i> *	Pavlinec et al. (2020)
<i>Aeromonas simiae</i>	Mathai et al. (2021)	<i>Rickettsiales</i>	Rubiolo et al. (2018)
<i>Aeromonas sobria</i> */**	Mathai et al. (2021)	<i>Salmonella enterica</i>	Mathai et al. (2021)
<i>Aeromonas verinii</i> */**	Mathai et al. (2021)	<i>Salmonella spp.</i>	Alma et al. (2020)
<i>Aliivibrio</i> *	Pavlinec et al. (2020)	<i>Shewanella</i>	Lokmer & Wegner (2014)
<i>Aliivibrio salmonicida</i> *	Lattos et al. (2020)	<i>Tenacibaculum</i>	Fernández et al. (2014); Schill; Iwanowicz & Adams (2017); Dubé; Ky; Planes (2019)

<i>Alteromonas</i>	Pavlinec et al. (2020)	<i>Tenacibaculum soleae</i> **	Burioli et al. (2017)
<i>Aquimarina</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017)	<i>Vibrio aestuarianus</i>	Burioli et al. (2017); Vezzulli et al. (2018)
<i>Arcobacter</i> *	Lokmer & Wegner (2014); Burioli et al. (2017); Li et al. (2019a e 2019b); Dubé; Ky; Planes (2019); Horodesky et al. (2020); Ianello et al. (2021)	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Leite et al. (2017)
<i>Chlamydia</i>	Fernández et al. (2014)	<i>Vibrio anguillarum</i>	Leite et al. (2017)
<i>Chryseobacterium</i> (spp. CF365)	Mathai et al. (2021)	<i>Vibrio campbellii</i>	King et al. (2021); Mathai et al. (2021)
<i>Escherichia coli</i>	Rubiolo et al. (2018); Vezzulli et al. (2018); Silva dos Santos et al. (2018); Alma et al. (2020); Mathai et al. (2021)	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Leite et al. (2017); Zhao et al. (2019)
<i>Francisella</i> *	Li et al. (2019-II)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> **	Li et al. (2019b)
<i>Haplosporidium pinnae</i>	Lattos et al. (2020)	<i>Vibrio harveyi</i>	Fdhila et al. (2017); Offret et al. (2019); King et al. (2021)
<i>Lysinibacillus</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017)	<i>Vibrio mediterranei</i> *	Lattos et al. (2020)
<i>Marinobacter</i> (spp. X15-166B)	Mathai et al. (2021)	<i>Vibrio owensii</i>	King et al. (2021)
<i>Mycobacterium</i> *	Pavlinec et al. (2020); Lattos et al. (2020)	<i>Vibrio rotiferianus</i>	King et al. (2021)
<i>Mycoplasma</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017); Horodesky et al. (2020)	<i>Vibrio splendidus</i> **	Burioli et al. (2017); Vezzulli et al. (2018); Pavlinec et al. (2020); Musella et al. (2019)
<i>Oceanospirillum</i>	Horodesky et al. (2020)	<i>Vibrio tapetis</i>	Leite et al. (2017)
<i>Orientia</i>	Schill; Iwanowicz & Adams (2017)	<i>Vibrio tubiashii</i>	Lokmer & Wegner (2014)
<i>Paraheinheimera texasensis</i>	Mathai et al. (2021)		

* bactéria ou gênero relatado como oportunista; ** bactéria ou gênero relacionado a mortandade.

5.2.2 Dieta

A relação entre bivalves e microrganismos pode ser compreendida a partir da análise do método pelo qual estes animais se alimentam. Através da filtração, bivalves tendem a acumular em seus tecidos microrganismos que estabelecem relações mutualísticas com o seu hospedeiro. No entanto, tais relações também podem expressar caráter patogênico para os bivalves (Pierce & Ward, 2018).

O uso de microalgas ou detritos unicelulares de algas (DUA) como dieta alternativa em incubadoras de bivalves é um processo conhecido por diminuir os custos e aumentar a capacidade de produção. As incubadoras da ostra *Crassostrea gigas*, por exemplo, precisam fornecer microalgas para sua alimentação (Peña-Rodríguez et al., 2020).

Peña-Rodríguez et al. (2020) descobriram que a microbiota de *C. gigas* é alterada de acordo com a alimentação recebida, que determina a sobrevivência, o crescimento e o bem estar das ostras. O uso prolongado de DUA *Porphyra spp.* pode causar a morte do cultivo a partir de oito dias; por outro lado, a alimentação com microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* favorece a sobrevivência das ostras. Esses dados podem ser observados na tabela 3.

Peña-Rodríguez et al. (2020) também verificaram semelhança na composição da microbiota entre os grupos de ostras alimentados com DUA *U. lactuca*, DUA *Ulva clathrata* e microalgas, com predominância de bactérias dos filos *Proteobacteria* (77.5% – 85.1%) e *Bacteroidetes* (7.5% – 11.1%), seguidas por *Firmicutes* (1% – 10%), *Tenericutes* (0% – 4.6%), *Cyanobacteria* (0% – 3%), *Actinobacteria* (0.1% – 1.4%) e *Planctomycetes* (0.1% – 1.6%). Esses resultados estão de acordo com a descrição da microbiota de *C. gigas* feita por outros pesquisadores (Pathirana et al., 2019; Fernández et al., 2014 & 2012).

Em comparação à alimentação por microalgas, ostras alimentadas com DUA *U. lactuca* e *U. clathrata* exibiram aumento das ordens *Vibrionales* (23.6% e 37.7%, respectivamente) – embora não tenham exibido patologia –, *Campylobacteriales* (4.6% e 6%) e *Clostridiales* (9.9% e 3,4%); e diminuição das ordens *Pseudomonadales* (0.6% e 3.6%), *Rhizobiales* (0.8%), *Sphingomonadales* (0.8% e 0.9%) e *Burkholderiales* (0.2% e 0.5%) (Peña-Rodríguez et al., 2020).

Os resultados de Peña-Rodríguez et al. (2020) sugerem que a sobrevivência de *C. gigas* nas incubadoras é favorecida pela alimentação por microalgas das espécies *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans*, sendo possível também a dieta alternativa por detritos unicelulares de algas *Ulva lactuca* e *Ulva clathrata*.

Ademais, com a mortalidade total de *C. gigas* observada no 12º dia do estudo, a dieta a base de DUA *Porphyra spp.* é desaconselhada. Peña-Rodríguez et al. (2020) apontam a composição rica em polissacarídeos como a causa para a mortalidade observada no grupo

alimentado com DUA *Porphyra spp.*, uma vez que a sua composição favorece a obstrução das brânquias das ostras ao formar detritos de baixa solubilidade na água marinha, presente nos aquários do experimento. Portanto, a capacidade de filtração de *C. gigas* foi reduzida.

Tabela 3: alteração da composição da microbiota da ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*) em relação à dieta recebida.

Bivalve spp.	Dieta	Sobrevivência bivalve	Microbiota (antes)	Microbiota (após dieta)	Referência
<i>Crassostrea gigas</i>	D.U.A <i>Ulva lactuca</i>	93,80%		↑ <i>Vibrionales</i> ; ↓ <i>Pseudomonadales</i>	Peña-Rodríguez et al., 2020
	D.U.A <i>Ulva clathrata</i>	56,30%	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Bacteroidetes</i> ;		
	D.U.A <i>Porphyra</i>	0%	<i>Firmicutes</i> ; <i>Tenericutes</i> ;	-	
	<i>Isochrysis galbana</i>	100%	<i>Cyanobacteria</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Planctomycetes</i>	-	
	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	100%		-	

D.U.A = detritos unicelulares de algas; ↑ = aumento; ↓ = decréscimo.

Pierce & Ward (2019) analisaram a composição do microbioma intestinal de *C. virginica* e *M. edulis*, e a compararam com o microbioma presente nos agregados em suspensão no local onde os bivalves foram coletados. A hipótese era de que os agregados ingeridos durante a filtração teriam composição semelhante ao microbioma observado nos bivalves, estabelecendo uma relação.

Através da amplificação da região V4 do gene 16S rRNA com posterior análise PCR, Pierce & Ward (2019) acessaram a composição do microbioma do intestino dos espécimes de *C. virginica* e *M. edulis*. Os resultados revelaram 781 e 989 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) nas amostras de intestino dos bivalves, respectivamente, e 1.004 OTUs nas amostras de agregados em suspensão. Os filos mais abundantes em todas as amostras foram *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Cladithrix*, *Fusobacteria* e *Spirochaetes*.

A composição do microbioma das ostras era formada predominantemente dos filos *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Planctomycetes*; enquanto o microbioma dos mexilhões era predominante de *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria* e *Bacteroidetes*. As ordens que mais se destacaram nas ostras foram *Mycoplasmatales*, *Verrucomicrobiales*, *Desulfobacterales*, *Campylobacterales* e

Alteromonadales. E as ordens que mais se destacaram nos mexilhões foram *Burkholderiales*, *Verrucomicrobiales*, *Desulfobacterales*, *Alteromonadales* e *Pirellulales* (Pierce & Ward, 2019).

Os agregados em suspensão eram compostos principalmente por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Planctomycetes*, embora também apresentassem os filos *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Cladithrix* em menor abundância. As ordens mais abundantes no microbioma dos agregados foram *Alteromonadales*, *Syntrophobacterales*, *Oceanospirillales*, *Brachyspiralles* e *Campylobacterales* (Pierce & Ward, 2019).

Em geral, a composição do microbioma das espécies sofreu pouca variação com o tempo, sendo alterada apenas a abundância de alguns filos, mas não a sua dominância. Pierce & Ward (2019) destacam a presença de três cepas de *Phaeobacter spp.* no microbioma base de ambas as espécies de bivalves, um fato interessante considerando que o gênero é conhecido por conter bactérias probióticas contra os patógenos de bivalves *Vibrio spp.* e *Roseovarius spp.* (Zhao et al., 2019; Pierce & Ward, 2019). Ao todo, o microbioma base das amostras de *C. virginica*, *M. edulis* e agregados em suspensão compartilham 63 OTUs. Com esses resultados, Pierce & Ward (2019) concluíram que o microbioma das espécies era semelhante entre si devido ao local de coleta e partículas em suspensão utilizadas na alimentação dos bivalves serem os mesmos.

5.3 Fatores abióticos

5.3.1 Temperatura e pH

As mudanças climáticas globais têm efeitos profundos no ecossistema marinho por alterar as funções fisiológicas e comportamentos dos organismos (Vaughn & Hoellein, 2018; Brierley and Kingsford, 2009). A acidificação dos oceanos e o aumento da temperatura devido à alta absorção do dióxido de carbono atmosférico podem influenciar significativamente na fisiologia, no crescimento e na sobrevivência de organismos marinhos. Apesar dos esforços crescentes de pesquisa, ainda há lacunas no conhecimento sobre como esses estressores interagem para afetar econômica e ecologicamente espécies importantes (Alma et al., 2020).

A variação de temperatura está afetando taxas metabólicas e respiratórias de animais ectotérmicos. Presumivelmente, organismos de baixa tolerância ao estresse são suscetíveis a surtos de doenças, que estão associados com declínio de população (Harvell et al., 2002; Doney et al., 2012). A saúde dos organismos marinhos está balanceada com seus microbiomas, de modo que microrganismos benéficos prosperam enquanto microrganismos virulentos são controlados. Esse equilíbrio pode ser desestabilizado por fatores estressantes e ocasionar declínios na saúde do hospedeiro, favorecendo o surgimento de doenças (Apprill, A., 2017).

A microbiota intestinal desempenha um papel muito importante na saúde do hospedeiro, como a proteção contra patógenos e a manutenção da homeostase. A investigação filogenética de comunidades por reconstrução de estados não observados (PICRUST) revelou que o microbioma intestinal dos mexilhões está associado a muitas funções importantes, como no transporte e metabolismo de aminoácidos, transcrição, produção e conservação de energia, biogênese da parede celular, da membrana e do envelope, dentre outras funções (Khan et al. 2021). Neste tópico foram revisados os estudos que relacionaram a temperatura e/ou o pH à influência na microbiota intestinal de bivalves.

Em resposta às mudanças climáticas globais, houve uma mudança da distribuição biogeográfica de organismos marinhos móveis (Beaugrand et al., 2002). Organismos sésseis, como algumas espécies de bivalves, são mais propensos à mortalidade em massa no verão por tolerarem baixas variações de temperatura (Myrand et al., 2002; Malham et al., 2009; Li et al., 2019a e 2019b). Evidências mostraram que a exposição à alta temperatura da água (27°C) alterou o microbioma da hemolinfa do mexilhão *Mytilus coruscus*, composto majoritariamente pelos gêneros *Proteobacteria*, *Epsilonbacteraeota* e *Bacteroidetes*. As alterações levaram à diminuição da capacidade de microrganismos benéficos eliminarem infecções (como a de *Vibrio cyclitrophicus*), e favoreceram a colonização de bactérias oportunistas dos gêneros *Arcobacter* e *Francisella* (Li et al., 2019b).

Portanto, o distúrbio do microbioma poderia refletir no status de saúde do hospedeiro (Li, et al., 2019b). Ainda no ano de 2019, os mesmos autores retornaram ao local de coleta de *M. coruscus* para avaliar se as mudanças observadas no microbioma desta espécie seriam relatadas também no microbioma do mexilhão *M. galloprovincialis* (Li et al., 2019a). Para isso, os autores avaliaram o microbioma intestinal de *M. galloprovincialis* através do sequenciamento do gene 16S rRNA, submetido a um estresse de temperatura.

A análise da microbiota intestinal de *M. galloprovincialis* revelou predominância dos filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* em mexilhões expostos à temperatura de 21°C; enquanto naqueles expostos à 27°C houve aumento dos filos *Proteobacteria* e *Epsilonbacteraeota*, e diminuição do filo *Bacteroidetes* (Li et al., 2019a). Além disso, a Análise Discriminante Linear (LEfSe) revelou a abundância relativa dos gêneros *Vibrio* e *Arcobacter* apresentada em animais vivos como os principais biomarcadores durante a exposição inicial a 27°C, seguida pela flutuação na composição do microbioma com o aumento do tempo de exposição nos dias 4 e 7. A proliferação de agentes patogênicos oportunistas observados na pesquisa se trata de um fator que pode aumentar a susceptibilidade do hospedeiro à doença, contribuindo fortemente para a mortandade (Li et al., 2019a).

A temperatura da água de coleta também foi um fator determinante para a presença de gêneros específicos de bactérias no mexilhão *Pinna nobilis* (Pavlinec et al., 2020). As colônias foram identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Os clados predominantes nos espécimes analisados foram: *Aestuariibacter spp.*, *Aliivibrio spp.*, *Alteromonas spp.*, *Marinobacter spp.*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Rubritalea spp.*, *Thalassospira spp.*, *Vibrio splendidus*, *Mycobacterium spp.* e *Psychrobacter spp.* (glândula digestiva e músculo adutor), *Pseudoalteromonas spp.* (glândula digestiva), *Photobacterium spp.* e um organismo similar a *Spirochaeta* no manto (Pavlinec et al., 2020).

Pavlinec et al. (2020) observaram uma relação direta entre a presença de alguns clados e a temperatura da água onde os mexilhões foram coletados. Os clados *Aestuariibacter spp.* e *Rubritalea spp.* somente estavam presentes em águas de 13° C, enquanto *Alteromonas spp.* e *Thalassospira spp.* foram encontrados em águas de temperatura variando entre 15° C e 19° C. *Vibrio splendidus* foi a única bactéria presente em todos os espécimes de forma independente à temperatura da água onde foram coletadas. Todas as espécies de bactérias descritas para a microbiota de *P. nobilis* são onipresentes no ambiente marinho, sendo simbioses benéficos – embora *Aliivibrio spp.*, *Alteromonas spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Photobacterium spp.* e *Pseudoalteromonas spp.* possam se comportar como patógenos oportunistas. No mais, mortandades de bivalves associadas à *Vibrio splendidus* são conhecidas; e *Psychrobacter spp.*, apesar de ser capaz de produzir metabólitos antimicrobianos, também pode se comportar como um patógeno oportunista (Pavlinec et al., 2020).

Já no estudo de Scanes et al. (2021), a ostra-da-rocha de Sydney, *Saccostrea glomerata*, foi exposta a combinações de temperatura (24 e 28 °C) e pCO² (400 e 1000 µatm) durante oito semanas. A microbiota da hemolinfa foi caracterizada através do sequenciamento de amplicons das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, apontando predominância das classes *Bacteroidia*, *Campylobacteria*, *Spirochaetia* e *Gammaproteobacteria* sob a temperatura de 24°C (Scanes et al., 2021). Pôde-se observar que o pCO² elevado e a temperatura interagiram para alterar o microbioma de *S. glomerata*, uma vez que as classes de bactérias predominantes em sua hemolinfa tiveram sua abundância reduzida. O pCO² elevado foi o fator que mais afetou a diversidade e riqueza de espécies da microbiota, embora a temperatura elevada também tenha aumentado a riqueza de espécies (Scanes et al., 2021). Sendo assim, os autores concluem que as alterações climáticas, como o aquecimento e a acidificação dos oceanos (OW e OA, respectivamente), são capazes de alterar o microbioma de *S. glomerata*, podendo aumentar a susceptibilidade das ostras às infecções (Scanes et al., 2021).

Alma et al. (2020) foram os primeiros a explorar os efeitos fisiológicos da alta pCO² e da temperatura sobre o potencial de aclimação de *Crassadoma gigantea*. Os espécimes foram expostos a duas condições de pCO² (365 e 1050 µatm) e temperatura (14 e 21.5°C). A exposição simultânea aos dois fatores de temperatura e alto pCO² reduziu a resistência da concha, diminuiu sua densidade externa e aumentou o conteúdo total de lipídios. Todos os espécimes do estudo continham ao final pelo menos uma quantidade residual de *Vibrio spp.*, e é provável que as condições estressantes e de maior temperatura do experimento tenham permitido a proliferação de microrganismos patogênicos (Alma et al., 2020).

Apesar de dietas idênticas, os bivalves expostos a pCO² elevado apresentaram maior teor de ácidos graxos saturados, e menor teor de ácidos graxos poli-insaturados; o que sugere a reorganização das cadeias de ácidos graxos para sustentar funções metabólicas básicas sob alto pCO². Um indivíduo no experimento exposto simultaneamente a OW e OA teve sua composição microbiana dominada por *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* também se proliferaram à medida que a temperatura aumentou (Kumar et al., 2015; Pachepsky et al., 2014).

Khan et al. 2021 direcionaram seu estudo a avaliar os efeitos combinados de pH baixo, baixos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e aquecimento na microbiota intestinal do mexilhão *Mytilus coruscus*. Os resultados do experimento mostraram que a acidificação, a hipóxia e o aquecimento afetaram a estrutura da comunidade microbiana, a riqueza de espécies e a diversidade da microbiota intestinal de *M. coruscus* (Khan et al., 2021). Os filos mais abundantes observados nos oito tratamentos a diferentes níveis de pH, OD e temperatura, foram *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, respectivamente. Khan et al. (2021) observaram que a análise de coordenadas principais (PCoA) evidencia que o baixo pH, o baixo índice de OD, e o aumento da temperatura, são fatores que podem alterar a microbiota e elevar a ocorrência de patógenos e bactérias oportunistas. Os autores destacam, também, que as mudanças observadas na riqueza e diversidade de espécies da microbiota de *M. coruscus* podem estar relacionadas à necessidade de o mexilhão ajustar suas atividades fisiológicas para sobreviver às condições ambientais desfavoráveis; alterando a estrutura de sua microbiota em consequência disso (Khan et al., 2021).

O hepatopâncreas é um tecido importante envolvido em vários metabolismos biológicos para bivalves, mas suas respostas à acidificação do oceano (OA) ainda não foram bem avaliadas (Zhang et al., 2021). Zhang et al. (2021) verificaram variações na capacidade antioxidante, habilidade digestiva e na composição da microbiota do hepatopâncreas de *C. gigas* sob diferentes condições de pH. Os autores concluíram que a abundância total de espécies e a diversidade da microbiota do hepatopâncreas de *C. gigas* sofreram uma

mudança dinâmica, que diminuiu após a acidificação de longo prazo. A estrutura da microbiota do hepatopâncreas foi alterada drasticamente com a mudança das espécies dominantes de aeróbicas para anaeróbicas e anaeróbias facultativas, e houve a proliferação anormal de algumas espécies, como o gênero *Mycoplasma* e a ordem *Clostridiales* (Zhang et al., 2021).

No último estudo do tópico, Wathsala et al. (2021) investigaram possíveis interações entre fatores ambientais (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e estações do ano), maturação sexual dos espécimes, e a composição do microbioma de *Mytilus galloprovincialis*. A análise se deu por sequenciamento *next-generation* da região V3-V4 do gene 16S rRNA.

Wathsala et al. (2021) ilustram a composição do microbioma de 41 espécimes de *M. galloprovincialis* de acordo com as variáveis analisadas. Os filos mais abundantes em todas as amostras foram *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*. A abundância de *Proteobacteria* foi constante durante todo o período de coleta; mas as amostras coletadas durante o inverno tiveram aumento de *Firmicutes*, e as do verão apresentaram mais *Tenericutes*. Wathsala et al. (2021) encontraram correlação entre o microbioma e o sexo dos mexilhões. Em machos, houve maior abundância dos filos *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* e *Chlamydiae*; enquanto nas fêmeas a abundância dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* foi maior. Não obstante, a abundância de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Tenericutes* parece estar correlacionada às mudanças transcriptômicas entre as amostras do inverno/verão; enquanto a abundância de *Chlamydiae* e *Planctomycetes* parece estar mais correlacionada ao sexo dos espécimes de *M. galloprovincialis* (Wathsala et al., 2021).

Com relação aos outros parâmetros observados, todos os produtos gênicos exibiram padrões de transcrição complexos ao longo das estações. A salinidade, o oxigênio dissolvido e a transparência correlacionaram-se significativamente com os perfis de transcrição dos machos; enquanto nas fêmeas, a temperatura e a maturação gonadal explicam em grande parte as mudanças de transcrição observadas. Assim sendo, os resultados de Wathsala et al. (2021) nos informam que o microbioma de *M. galloprovincialis* pode variar naturalmente de acordo com o sexo do espécime e as condições climáticas no momento da coleta, sendo necessário considerar esses fatores em estudos que visem a descrever o microbioma dessa espécie. Essa compreensão fornece um viés para melhorar as estratégias atuais de monitoramento das condições de cultivo de mexilhões, além de prever possíveis impactos prejudiciais das mudanças climáticas na área de estudo.

5.3.2 Contaminantes ambientais

Os microplásticos (MPs), partículas menores que 5 mm, foram encontrados nos mais diversos locais do mundo – especialmente no oceano. Devido ao tamanho pequeno, os MPs podem ser ingeridos por animais e entrar na cadeia trófica marinha, favorecendo a acumulação dessa substância. Os MPs podem afetar a saúde dos animais causando danos físicos ao trato digestivo, liberando componentes químicos e atuando no transporte de poluentes ambientais e agentes patogênicos para os animais (Li et al., 2020).

No estudo realizado por Li et al. (2020), foram investigados os impactos da ingestão de microplástico na microbiota intestinal de mexilhões *M. edulis*. Antes da aclimatação, a microbiota intestinal de *M. edulis* era composta principalmente pelos gêneros *Flavobacteriales*, *Fusobacteriales*, *Pirellulales*, *Rhodobacterales* e *Microtrichales*. Após a aclimatação, os gêneros mais abundantes eram *Campylobacterales*, *Bacteroidales*, *Flavobacteriales*, *Vibrionales* e *Alteromonadales* (Li et al., 2020).

A influência na microbiota intestinal do mexilhão foi investigada com o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA extraído do homogenato intestinal. Em comparação com os mexilhões não expostos, foi observada alteração da microbiota intestinal depois que os mexilhões foram expostos a MPs por uma semana, três semanas, seis semanas, e até mesmo após oito dias de depuração pós-exposição. A microbiota que resistiu após a exposição aos MPs e depuração teve seus gêneros mais abundantes alterados para *Caulobacterales*, *Oceanospirillales*, *Parvibaculales*, *Rhodospirillales* e *Planctomycetales* (Li et al., 2020).

Li et al., (2020) observaram que grânulos fecais contendo microrganismos da microbiota intestinal alterada e MPs podem influenciar ainda mais na microbiota do ambiente circundante – demonstrando os impactos da exposição a MPs na microbiota intestinal de mexilhões –, e sugeriram possíveis efeitos consequentes sobre a qualidade e a segurança dos alimentos. Para estudos futuros, os autores sugerem a preocupação com o bem-estar da rede alimentar marinha.

Além dos MPs, outros agressores, como os resíduos químicos do escoamento agrícola, colocam em risco a saúde da microbiota de bivalves, sua sobrevivência e seu desenvolvimento. No entanto, os efeitos ecológicos dessa interação a longo prazo ainda são pouco conhecidos (Britt et al., 2020). No estudo de Britt et al. (2020), buscou-se investigar como a dinâmica da microbiota de todos os tecidos de *Crassostrea virginica* era alterada em virtude dos efeitos da atrazina, um herbicida do tipo triazina muito usado em plantações de milho. As análises revelaram que os gêneros de bactérias dominantes encontrados em todos

os grupos incluíram aqueles pertencentes a *Pseudoalteromonas*, *Burkholderia*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Allobaculum*, *Ruminococcus* e *Nocardia* (Britt et al., 2020).

Britt et al. (2020) relatam uma descoberta inovadora: ostras expostas a concentrações de atrazina tão baixas quanto 3 µg/L apresentaram uma perda significativa de uma espécie microbiana mutualística chave, além de uma subsequente colonização da bactéria patogênica *Nocardia*. Como conclusão, foi possível identificar que a exposição à atrazina na Baía de Chesapeake pode estar contribuindo para uma mudança significativa no microbioma de ostras jovens, reduzindo sua aptidão e dificultando a sobrevivência da população da espécie no local (Britt et al., 2020).

No estudo de Iannello et al. (2021), foi apresentada a hipótese de que a exposição crônica a poluentes pode ter efeitos substanciais no hologenoma do bivalve *Ruditapes philippinarum*, muito tempo depois de serem removidos de locais contaminados.

Inicialmente, a microbiota da glândula digestiva de *R. philippinarum* era composta pelos filos *Proteobacteria* (59%), *Tenericutes* (26.1%), *Chlamydiae* (5.4%), *Spirochaetes* (4.8%) e *Bacteroidetes* (3.4%); sendo as classes mais abundantes *Alphaproteobacteria* (47.6%), *Mollicutes* (26.1%) e *Gammaproteobacteria* (6.1%). O gênero *Mycoplasma* era o mais representativo, presente em 25% das amostras (Iannello et al., 2021). Após um mês da transplantação, *R. philippinarum* de PM mostraram severas modificações na resistência de suas microbiotas, incluindo uma alta representação do patógeno oportunista *Arcobacter* spp. (Iannello et al., 2021). Após os seis meses, bivalves de PM demonstraram uma baixa capacidade de responder aos estresses ambientais relacionados à temporada de verão; sugerindo que a variação de sua microbiota parece estar atribuída à sazonalidade das estações (Iannello et al., 2021).

Lori et al. (2020) trazem a questão do glifosato – uma substância química que é ingrediente ativo de vários herbicidas e defensivos agrícolas utilizados no controle de plantas daninhas – e do seu subproduto ácido aminometilfosfônico (AMPA), molécula de longa persistência e alto potencial para interferir na qualidade do ecossistema.

Embora o potencial do glifosato para induzir uma ampla gama de efeitos biológicos em organismos expostos tenha sido demonstrado, os mecanismos moleculares globais de toxicidade e os efeitos potenciais em simbiontes bacterianos ainda não estão claros; em particular para espécies marinhas ecologicamente importantes, como bivalves (Lori et al., 2020). No estudo de Lori et al. (2020), os efeitos do glifosato (GLY), do ácido aminometilfosfônico (AMPA) e uma mistura de ambos (MIX) sobre a microbiota da glândula digestiva do mexilhão *M. galloprovincialis* foram avaliados em um experimento controlado. Foi

utilizado o sequenciamento *next-generation* do gene 16S rRNA para avaliar os efeitos a nível molecular, tanto no hospedeiro quanto em sua microbiota; composta principalmente por *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Alphaproteobacteria*, *Mollicutes*, *Fusobacteriia*, *Deltaproteobactria* e *Spirochaetia* (Iori et al., 2020).

Os resultados de Iori et al. (2020) sugerem que a capacidade variável das espécies bacterianas de proliferar na presença desses compostos, e o comprometimento da homeostase fisiológica do hospedeiro devido à toxicidade de AMPA e GLY, podem causar perturbações significativas na microbiota da glândula digestiva, além de estimular a disseminação de patógenos potencialmente oportunistas, como *Vibrio spp.* Os autores alertam sobre os potenciais efeitos adversos do glifosato e do AMPA em espécies marinhas, sugerindo que tanto os efeitos da toxicidade direta quanto às mudanças subsequentes na comunidade microbiana do hospedeiro devem ser levados em consideração para determinar o risco toxicológico geral desses compostos ao ecossistema.

5.4 Fatores concomitantes

Neste tópico foram agrupados os estudos que descrevem fatores concomitantes; ou seja, que relacionam fatores bióticos e abióticos à saúde de bivalves – cujos resultados das pesquisas são indistinguíveis.

É bem demonstrado que alguns probióticos melhoram a qualidade da água de cultivo e, assim, têm efeitos benéficos nos organismos criados (Fdhila et al., 2017). Fdhila et al. (2017) determinam o efeito do consórcio de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* e *B. coagulans*) em *Crassostrea gigas* criadas em dois cenários: em água do mar contaminada com corante azul previamente tratada com *Bacillus*, ou em água contaminada e não tratada. Para isso, foi analisada a morte de hemócitos usando a análise de citometria de fluxo.

A percentagem de descoloração do corante azul na água do mar contaminada na presença de *C. gigas* aumentou de 41% para 90%, ao usar o consórcio de *Bacillus*. Nessas condições, a mortalidade de hemócitos de *C. gigas* criadas diminuiu de 87% (na água contaminada e não tratada) para 56% - além de reduzir a proliferação do patógeno *Vibrio harveyi*. Sendo assim, foi demonstrado que o tratamento prévio com o consórcio de *Bacillus spp.* reduziu a mortalidade de ostras, aumentou sua defesa contra uma cepa patogênica, e melhorou as condições de sobrevivência da ostra à exposição ao corante azul, em comparação com os efeitos da água do mar contaminada e não tratada (Fdhila et al., 2017).

A contaminação por metais, predominantemente mercúrio (Hg), também foi um estressor para a microbiota observado por Leite et al. (2017). Os pesquisadores coletaram amêijoas *Ruditapes philippinarum* em três locais: 1. estuário historicamente afetado por efluentes com Hg (Laranjo); 2. ponto no mesmo estuário, mas menos afetado por Hg (Ílhavo);

e 3. ponto em uma baía de baixo nível de contaminação, considerada limpa (Arguin). Em cada local foram coletados três espécimes de aspecto saudável. Para análise da microbiota, a hemolinfa, o manto e as brânquias foram extraídos dos nove espécimes. A hemolinfa foi homogeneizada e cultivada em placas de ágar, enquanto os demais tecidos foram lavados em água esterilizada e posteriormente homogeneizados para cultivo em placas de ágar. Para acessar o DNA nos tecidos e determinar os táxons presentes, foi utilizada a técnica de amplificação do gene 16S rRNA por PCR (Leite et al., 2017).

Um total de 240 bactérias foram isoladas, sendo 79 bactérias em espécimes do ponto 1-Laranjo (30 = brânquias, 23 = hemolinfa, 26 = manto), 68 do ponto 2-Ílhavo (18 = brânquias, 26 = hemolinfa, 24 = manto), e 93 do ponto 3-Arguin (37 = brânquias, 23 = hemolinfa, 33 = manto). Destes, 198 bactérias distintas foram selecionadas para identificação através do sequenciamento genético. Os resultados de Leite et al. (2017) evidenciaram a predominância dos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, em abundâncias semelhantes entre os locais de coleta dos espécimes. Nos pontos afetados pela contaminação por Hg (1-Laranjo e 2-Ílhavo), houve presença do filo *Bacteroidetes* e predominância da família *Vibrionaceae* nas brânquias, manto e hemolinfa dos espécimes de *R. philippinarum* coletados no ponto 2, e predominância da família *Microbacteriaceae* nos tecidos das amêijoas coletadas no ponto 1. A família *Pseudoalteromonadaceae* esteve presente em todos os espécimes, embora tenha sido mais abundante nos tecidos dos espécimes coletados no ponto considerado limpo (3-Arguin).

Ainda com relação à presença de Hg, no ponto 2-Ílhavo houve predominância do filo *Proteobacteria*, enquanto no ponto 1-Laranjo o filo predominante foi *Actinobacteria*. Neste último filo estão as bactérias capazes de reduzir metais a sua forma menos tóxica, o que sugere a capacidade de *R. philippinarum* selecionar a microbiota persistente em seu organismo, sendo a tolerância aos contaminantes metálicos um critério para tal seleção (Leite et al., 2017).

No estudo de Li et al. (2019b) foi investigado o efeito de infecção prévia com o patógeno *Vibrio cyclitrophicus*, seguido de exposição ao aumento da temperatura da água no mexilhão *M. coruscus*. A exposição prévia ao patógeno *Vibrio cyclitrophicus* resultou em alta mortalidade dos mexilhões a 27°C. A análise mostrou que a exposição ao *Vibrio* promoveu a proliferação de patógenos oportunistas dos gêneros *Arcobacter* e *Francisella* em uma temperatura mais baixa. Além disso, foi observada uma redução na diversidade da comunidade microbiana na hemolinfa dos mexilhões expostos ao *V. cyclitrophicus*.

Os dados de Li et al. (2019b) indicam que a dinâmica da comunidade microbiana pode ter espécies únicas de biomarcadores, que podem ser usados como indicadores de saúde na

hemolinfa do mexilhão. Em condições de temperatura elevada, a capacidade de eliminação bacteriana contra infecções na hemolinfa do mexilhão pode ser reduzida.

A microbiota normalmente fornece benefícios ao hospedeiro, como defesa contra patógenos externos. No entanto, dependendo do ambiente, as comunidades microbianas associadas ao hospedeiro podem se tornar uma fonte de patógenos oportunistas (Lokmer & Wegner, 2014). No estudo feito por Lokmer & Wegner (2014), foi investigado como a temperatura afeta a microbiota da hemolinfa de *C. gigas*. Foi realizado um experimento com ostras aclimatadas a diferentes temperaturas, posteriormente expostas ao estresse térmico e a uma cepa virulenta de *Vibrio spp.*

A análise mostrou que a dinâmica microbiana e a composição das comunidades foram afetadas pela temperatura e pelo estresse térmico, mas não pela infecção. Ostras saudáveis apresentaram estabilidade dinâmica em seu microbioma, enquanto ostras mortas ou moribundas apresentaram desestruturação da comunidade microbiana. Os resultados de Lokmer & Wegner (2014) destacam a importância dos fatores abióticos e bióticos nas respostas da microbiota associada ao hospedeiro, e sua relação com a sobrevivência durante infecções.

Mathai et al. (2021) buscaram descrever como a microbiota do mexilhão *Dreissena polymorpha* respondia às variações de temperatura (26°C a 32°C) e salinidade (até 13,5 ppt). Os autores descreveram a microbiota dos espécimes através de amostras do tecido total (homogenato), utilizando o gene 16S rRNA com posterior PCR. Os mexilhões vivos do grupo controle tiveram sua microbiota dominada por *Pseudomonas* (21%), *Legionella* (10.7%), *Chryseobacterium* (11.8%), "*Ca. Nucleicultrix*" (6.1%), *Burkholderiaceae* (3.8%) e *Aeromonas* (10.7%), e não foram observadas mortalidades. Já os mexilhões mortos submetidos ao estresse apresentaram aumento de *Aeromonas* (28.9%) e *Chryseobacterium* (12.9%), além de *Pseudomonas* (11.1%), *Flavobacterium* (8.5%) e *Rhodobacteraceae* (3.8%) (Mathai et al., 2021).

Mathai et al. (2021) observaram que a temperatura foi o principal fator responsável por alterar a dinâmica da microbiota de *D. polymorpha* e ocasionar mortalidades, embora a salinidade também tenha contribuído. Os fatores favoreceram a incidência de patógenos oportunistas, sendo observada a ocorrência de *Aeromonas verinii* em mexilhões mortos nos tanques submetidos ao estresse de temperatura, e *Aeromonas sobria* em mexilhões mortos submetidos ao estresse de salinidade (Mathai et al., 2021). Outros patógenos de bivalves relacionados ao gênero *Aeromonas* também foram encontrados em espécimes mortos, como *A. hydrophila*, *A. allosaccharophila*, *A. salmonicida*, *A. schuberti*, *A. media*, e *A. simiae*. Além desses, também foram observados em mexilhões mortos as bactérias *Chryseobacterium spp.*, *CF365*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Marinobacter spp.*, *X15-166B*, *Vibrio campbelli*

e *Paraheinheimeria texasensis*. Mathai et al. (2021) salientam que seus resultados não refletem necessariamente as mudanças de microbiota esperadas em *D. polymorpha* no ambiente natural, visto que foram observadas em um experimento controlado. Mas concluem que esses dados podem servir como base para conhecer a biologia desse mexilhão, e como ele interage com fatores bióticos e abióticos; um conhecimento útil considerando que se trata de uma espécie invasora (Mathai et al., 2021).

No estudo de Theerachat et al. (2020), foi realizada uma análise metagenômica das bactérias associadas ao berbigão *Anadara granosa*, um bivalve do Sudeste Asiático utilizado na alimentação. Foram coletados espécimes de seis fazendas no Golfo da Tailândia, sendo três localizadas na costa e três localizadas em lagoas continentais. Os padrões ambientais (temperatura, pH, salinidade e nível de OD) de cada local foram registrados, bem como os níveis de concentração dos metais cobre (Cu), cromo (Cr), e mercúrio (Hg), e do metaloide arsênio (As).

As análises de sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA obtidas a partir do homogenato de tecido total revelaram que os filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Cyanobacteria* estavam presentes em abundância na microbiota dos berbigões de todas as seis localidades, sofrendo mínima variação em decorrência dos padrões ambientais. Outros filos também presentes na microbiota de *A. granosa* em todos os locais foram *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* e *Acidobacteria* (Theerachat et al., 2020). Os autores concluem que os seus resultados podem ser utilizados para melhorar a compreensão sobre a microbiota dessa espécie, além de aprimorar a gestão da qualidade de produtos de origem marinha para oferecer maior segurança alimentar (Theerachat et al., 2020).

Por último, o estudo de Offret et al. (2020) investigou o efeito dos níveis de maré na microbiota das glândulas digestivas de ostras (*Crassostrea gigas*) e amêijoas (*Ruditapes philippinarum*), dois bivalves que ocupam nichos ecológicos diferentes. As ostras foram obtidas de uma criação livre de patógenos, feita com o método “*Naissain Standards elfremer*”, e as amêijoas foram obtidas de uma produção comercial. Quinze espécimes de ambas as espécies foram transferidos para o campo localizado na baía de Brest, na *Pointe du Chateau* (França), em um período livre de florações de microalgas, alterações de temperatura, ou eventos de mortandade de ostras. Após quatro meses os espécimes foram retirados do campo e submetidos à 14 dias de depuração, para avaliar a microbiota ambiental persistente em suas glândulas digestivas (Offret et al., 2020).

Com base no sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA, os autores descobriram que a microbiota ambiental era mais semelhante àquela apresentada por *C. gigas* do que por *R. philippinarum*. De modo geral, a microbiota dos bivalves e do ambiente

foi dominada pelos filos *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetae*, *Chlamydiae*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Planctomycetes* (Offret et al., 2020).

A microbiota ambiental representava a composição bacteriológica dos sedimentos e da água do mar. A dos sedimentos era dominada por *Desulfobacterales* (36%), *Campylobacterales* (30%), *Acidimicrobiales* (25%) e *Fusobacteriales* (7%); enquanto a água do mar era dominada por *Rhodobacterales* (66%), *Campylobacterales* (14%), *Desulfobacterales* (10%), *Acidimicrobiales* (5%) e *Fusobacteriales* (3%) (Offret et al., 2020). Antes da transferência para o campo, Offret et al. (2020) avaliaram que a microbiota da glândula digestiva de *C. gigas* era dominada por *Mycoplasmatales* (87%), enquanto a de *R. philippinarum* era dominada por *Mycoplasmatales* (43%), *Chlamydiales* (23%), *Rickettsiales* (21%) e *Spirochaetales* (10%).

A transferência para o campo alterou a dinâmica da microbiota dos bivalves, especialmente com relação a *Mycoplasmatales* e *Rhodobacterales* nas ostras, e *Chlamydiales*, *Legionellales*, *Mycoplasmatales*, *Oceanospirillales*, *Rhodospirillales* e *Rickettsiales* nas amêijoas (Offret et al., 2020). A depuração influenciou a microbiota das espécies ao diminuir a abundância de *Mycoplasmatales*, *Desulfobacterales* e *Rhodobacterales* em ambas, favorecendo *Chlamydiales* nas ostras e *Spirochaetales* nas amêijoas. A localização intertidal de baixa maré também afetou a microbiota após 3.5 meses de transferência para o campo, favorecendo o aumento de *Rhodospirillales* em *C. gigas* e *Legionellales* em *R. philippinarum* (Offret et al., 2020). Em conclusão, os autores confirmaram as diferenças de microbiota entre os bivalves e o ambiente, sendo a microbiota da ostra mais suscetível às variações ambientais; enquanto a da amêijoas é mais estável – sugerindo melhor aptidão de *R. philippinarum* sobre *C. gigas* no que concerne à regulação da microbiota de sua glândula digestiva.

5.5 Possíveis aplicações biotecnológicas da microbiota: probióticos

Embora algumas espécies de bivalves possam abrigar bactérias patogênicas em sua microbiota sem apresentarem necessariamente os sinais de uma infecção, esses animais agem como carreadores passivos de patógenos que afetam a saúde humana (Gosling, 2015). Esse fator, e uma crescente preocupação com o alto consumo de agentes químicos na aquicultura, levaram à busca por métodos alternativos de controle de infecções.

Os probióticos são normalmente membros da microbiota saudável, portanto, podem oferecer um meio alternativo de reduzir o uso de antibióticos na aquicultura, uma vez que sua adição pode auxiliar na restauração de uma microbiota alterada para sua composição normal e benéfica (Kang et al., 2016). É importante ressaltar que, além de melhorar a saúde de peixes e moluscos, os probióticos na aquicultura também podem atuar no controle de patógenos e

melhorar a qualidade da água, modificando a composição microbiana da água e do sedimento (Kang et al. 2016).

Kang et al. (2016) investigou a atividade antimicrobiana de 65 cepas de *Lactobacillus spp.*, isoladas de amostras de bivalves, contra vários patógenos. Das 65 testadas, quatro cepas (HL1, HL12, HL20 e JL28) foram selecionadas após a identificação qualitativa de altos níveis de atividade antimicrobiana contra bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio ichthyenteri*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* e *Vibrio parahaemolyticus*. A análise de sequência do gene 16S rRNA revelou que as quatro cepas pertencem à espécie *Lactobacillus plantarum*. Além disso, sua sobrevivência foi testada em condições de sais biliares e acidez para demonstrar seu potencial uso como probióticos no trato gastrointestinal.

Zhao et al. (2019) isolaram da concha de uma ostra saudável (espécie não citada) uma cepa testada como probiótico. Trata-se da cepa S4Sm da bactéria *Phaeobacter inhibens* (*Roseobacter*), testada contra o patógeno de ostras *Vibrio coralliilyticus*, cepa RE22. A vibriose atinge principalmente a cultura larval de ostras. Causa necrose dos tecidos e leva à mortalidade em apenas um dia após infecção, e há diversos casos relatados em culturas da costa oeste dos Estados Unidos. Em um estudo anterior, os mesmos autores descobriram que a cepa probiótica era capaz de produzir biofilme e secretar ácido tropoditiético (TDA), que possui efeito antibiótico (Zhao et al., 2019).

Zhao et al. (2019) descobriram que a cepa S4Sm de *P. inhibens* foi capaz de inibir a atividade enzimática da cepa RE22 de *Vibrio coralliilyticus* por pelo menos uma hora após incubação – embora não tenha sido capaz de diminuir o crescimento do patógeno. Zhao et al. (2019) relataram interação interespecífica entre as cepas analisadas, com produção do agente anti-virulência *N-acyl homoserine lactones* (AHLs), capaz de limitar a habilidade da cepa patogênica RE22 de *Vibrio coralliilyticus* de se estabelecer no hospedeiro e causar sua infecção.

Sendo assim, o estudo de Zhao et al. (2019) comprovou a relação estabelecida no começo deste tópico. Bactérias naturalmente presentes na microbiota de um hospedeiro podem interagir com a comunidade bacteriana exógena, auxiliando no combate de patógenos. Se comprovada a eficácia, a cepa S4Sm de *P. inhibens* poderá ser biotecnologicamente utilizada como probiótico no cultivo de ostras.

King et al. (2021) destacaram a dominância de *Rhodobacteraceae*, sobretudo do gênero *Ruegeria*, nas conchas de *P. maxima*, como um fator a ser analisado. É sabido que o gênero está relacionado à rápida colonização de superfícies, e produz o ácido tropoditiético utilizado como antibiótico – além de outros componentes antibacterianos e anti-incrustantes

que diminuem, inclusive, o crescimento de *Vibrio spp.* Por isso, o uso de espécies do gênero *Ruegeria* como probióticos para a aquicultura vêm sendo explorado (King et al., 2021).

Outro probiótico promissor foi evidenciado em estudos de Fdhila et al. (2017): o consórcio bacteriano de *Bacillus subtilis*, *B. cereus* e *B. coagulans*, isolados da água de reuso da indústria têxtil, se mostrou eficiente na proteção dos hemócitos da ostra *Crassostrea gigas* cultivada em água do mar (Fdhila et al., 2017). Porém, durante os testes, a ostra acumulou em suas brânquias o corante, proveniente dos resíduos da indústria têxtil – representando um risco ao consumo humano (Fdhila et al., 2017).

A escolha das cepas de *Bacillus spp.* foi feita em virtude da sua esporulação característica, além da sobrevivência da espécie em águas de pH e salinidade elevados – como é o caso da água do mar. Fdhila et al. (2017) observaram que o corante azul é extremamente tóxico para *C. gigas*, pois a mortalidade de hemócitos foi maior na presença dele. Mas após o tratamento com o consórcio de *Bacillus spp.*, o contaminante passou a ser menos tóxico para as ostras, que o removeram com uma eficiência de 90%. Em manejos com o consórcio, que também se mostrou eficiente contra o patógeno *Vibrio harveyi*, as ostras tiveram mortalidade de hemócitos reduzida de 86% para 56%. Sendo assim, os autores concluíram que o consórcio bacteriano formado por *Bacillus subtilis*, *B. cereus* e *B. coagulans*, é um probiótico promissor para a aquicultura e incremento da biorremediação realizada pela ostra, ao filtrar a coluna d'água (Fdhila et al., 2017).

Para checar a atividade antimicrobiana das bactérias encontradas na microbiota de *R. philippinarum*, Leite et al. (2017) expuseram as placas de ágar ao ensaio de laboratório com sete patógenos marinhos conhecidos: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio alginolyticus* (isolado de um dos locais de coleta dos espécimes do estudo), *Vibrio tapetis*, *Vibrio coralliilyticus* e *Vibrio anguillarum*. Das 198 cepas encontradas, 29 demonstraram potencial probiótico contra ao menos um dos patógenos supracitados, sendo 16 cepas retiradas do manto, nove das brânquias, e quatro da hemolinfa dos bivalves. Os gêneros mais promissores foram: *Arthrobacter* (8 cepas), *Pseudoalteromonas* (6 cepas) e *Microbacterium* (4 cepas). A atividade antimicrobiana foi mais observada contra patógenos gram-negativos, sobretudo *V. coralliilyticus*, com 21 cepas possivelmente probióticas. No mais, sete cepas foram efetivas contra *V. alginolyticus* e uma contra *A. caviae*.

Leite et al. (2017) destacaram o potencial probiótico de duas cepas isoladas das brânquias de *R. philippinarum* (*Microbacterium* MA-B-19.4 e *Herbiconiux* MA-B-21.7), e quatro cepas isoladas do manto do bivalve (*Arthrobacter* MA-MT-19.2 e MA-MT-19.3, *Gaetbulibacter* MA-MT-20.6, e *Erythrobacter* MAMT-20.4). As seis cepas mencionadas exibiram o maior potencial de inibição dos patógenos, e todas vieram dos espécimes coletados no local mais afetado pela contaminação por mercúrio, o ponto 1-Laranjo. Os autores concluíram que a

microbiota de *R. philippinarum* pode ser um local promissor para a busca de probióticos para aquicultura, embora as cepas destacadas ainda necessitem de testes para confirmar sua eficácia, e estabelecer o meio de crescimento ideal e as doses recomendadas para uso.

Desde o final do século XX, mortalidades em massa têm sido fenômenos globais observados na aquicultura nos oceanos Pacífico e Atlântico. No que diz respeito ao abalone europeu *Haliotis tuberculata*, os eventos de mortalidade em massa ocorreram durante o período de desova com a elevação da temperatura da água do mar acima de 17°C. Eles foram atribuídos ao patógeno *Vibrio harveyi*. A vibriose de abalones começa com a colonização epitelial e mucosa das brânquias e da glândula hipobranquial, seguida pela multiplicação rápida na hemolinfa, levando a septicemia e morte (Offret et al., 2019).

A hemolinfa de invertebrados marinhos saudáveis é conhecida por abrigar bactérias pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas*, que são produtoras de antibióticos. Tais cepas são apontadas como probióticos potenciais para controlar doenças infecciosas na aquicultura. No estudo de Offret et al. (2019), foram examinadas uma coleção de cepas de *Pseudoalteromonas* isoladas da hemolinfa de ostras e mexilhões quanto à atividade antimicrobiana contra o *Vibrio harveyi*. Em seguida, a eficácia protetora da cepa mais ativa, identificada como hCg-6, foi investigada na cultura de abalones enfrentando uma infecção por *Vibrio harveyi* cepa ORM4.

A cepa hCg-6 foi considerada segura para os abalones e avaliada por sua capacidade de proteger contra o *Vibrio harveyi* (injeção de 1×10^3 *Vibrio* por animal). Após 15 dias da infecção, o tratamento com hCg-6 aumentou a taxa de sobrevivência dos abalones de 16% nos animais não tratados para 40% nos abalones tratados. O estudo concluiu que a atividade antibacteriana da cepa hCg-6 do gênero *Pseudoalteromonas* aumentou a proteção de *Haliotis tuberculata*, sendo uma cepa promissora contra a vibriose na espécie (Offret et al., 2019).

A microbiota desempenha um papel essencial na inibição da colonização por patógenos e na manutenção da saúde das ostras, mas existem dados limitados sobre suas diferentes fases de crescimento e condições (Fernández et al., 2012). Fernández et al. (2012) analisaram a composição da microbiota bacteriana de duas ostras comerciais: *Crassostrea gigas* e *Crassostrea corteziensis*. As diferenças na microbiota foram analisadas em três fases de crescimento: pós-larva na criação, e juvenis e adultos em dois locais de cultivo. As amostras de tecidos foram avaliadas por análise de PCR do gene 16S rRNA em DNA extraído de ostras depuradas. A análise revelou baixa diversidade bacteriana (principalmente β -*Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Spirochaetes*), sendo *Burkholderia cepacia* a bactéria mais abundante em ambas as espécies de ostras – um indicativo de possível potencial probiótico. A mesma espécie foi encontrada e novamente indicada como possível probiótico pelos autores em um estudo posterior (Fernández et al., 2014).

Schill; Iwanowicz & Adams (2017) destacaram que a maior parte do microbioma de *M. edulis* (75.6% das brânquias e 36.1% do intestino) está associado a uma única OTU não classificada, mas que está relacionada ao gênero *Endozoicomonas*, recentemente descrito como patógeno e/ou simbiote de invertebrados marinhos. No entanto, esse gênero também possui espécies relatadas como produtoras de agentes de defesa química. Como houve ocorrência de gêneros associados a patógenos no microbioma de *M. edulis*, e o gênero *Endozoicomonas* esteve presente predominantemente nas amostras das brânquias desse mexilhão, Schill; Iwanowicz & Adams (2017) sugerem que mais pesquisas devem ser feitas para estabelecer uma relação entre esses fatos; para então testar a eficácia de bactérias do gênero *Endozoicomonas* como possíveis probióticos para bivalves.

Outros estudos, como os de Dubé; Ky; Planes (2019), Pavlinec et al. (2020) e Pierce & Ward (2019) também destacaram em suas análises de microbiota de bivalves alguns gêneros de bactérias que merecem atenção na busca por probióticos: *Corynebacterium spp.*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Endozoicomonas spp.*, e *Rhodobacterales spp.*; *Psychrobacter spp.*; e *Phaeobacter spp.*, respectivamente. Todas elas, de alguma forma, exibiram relação com a sobrevivência de um bivalve a uma condição ambiental de desequilíbrio por serem persistentes em seus tecidos sem afetar negativamente a saúde de seu hospedeiro.

Na tabela 4 estão indicados os principais grupos de bactérias que ofereceram alguma proteção contra fatores diversos, já discutidos anteriormente; sendo, portanto, possíveis probióticos cuja eficácia deve ser explorada. Dessa forma, será possível determinar as doses recomendadas para o desenvolvimento de biotecnologias a serem aplicadas no manejo de bivalves. Todos esses grupos foram extraídos da microbiota de algum tecido das espécies de bivalves indicadas. São, portanto, membros naturais da microbiota desses organismos – algo que dificilmente oferecerá riscos à saúde do hospedeiro, e tampouco influenciará negativamente na qualidade da água ao entorno, ao contrário do uso comprovadamente maléfico de antibióticos (Yeh et al., 2020; Griffin et al., 2021b).

Tabela 4: Grupos de microrganismos isolados de bivalves destacados por seu potencial probiótico.

Bivalve spp.	Potencial probiótico isolado	Referência
<i>Pinctada margaritifera</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.; <i>Pseudoalteromonas</i> spp.; <i>Endozoicomonas</i> spp.; <i>Rhodobacterales</i> spp.	Dubé; Ky; Planes, 2019
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus coagulans</i>	Fdhila et al., 2017
<i>Crassostrea corteziensis</i> ; <i>Crassostrea gigas</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Fernández et al., 2012
<i>Crassostrea corteziensis</i> ; <i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Crassostrea sikamea</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Fernández et al., 2014
<i>Venerupis philippinarum</i> ; <i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Cyclina sinensis</i> ; <i>Mytilus edulis</i> ; <i>Macra veneriformis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> (cepas HL1, HL12, HL20 e JL28)	Kang et al., 2016
<i>Pinctada maxima</i>	<i>Ruegeria</i> spp.	King et al., 2021
<i>Venerupis philippinarum</i>	<i>Microbacterium</i> (cepa MA-B-19.4); <i>Herbiconiux</i> (cepa MA-B-21.7); <i>Arthrobacter</i> (cepas MA-MT-19.2 e MA-MT-19.3); <i>Gaetbulibacter</i> (cepa MA-MT-20.6); <i>Erythrobacter</i> (cepa MA-MT-20.4)	Leite et al, 2017
<i>Haliotis tuberculata</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> (cepa hCg-6)	Offret et al., 2019
<i>Pinna nobilis</i>	<i>Psychrobacter</i> spp.	Pavlinec et al., 2020
<i>Crassostrea virginica</i> ; <i>Mytilus edulis</i>	<i>Phaeobacter</i> spp.	Pierce & Ward, 2019
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Endozoicomonas</i>	Schill; Iwanowicz; Adams, 2017
-	<i>Phaeobacter inhibens</i>	Zhao et al., 2019

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e padrões observados, foi possível concluir que a microbiota de bivalves responde tanto a fatores bióticos quanto a abióticos. A análise dos artigos revelou que os gêneros de bivalves mais utilizados em estudos foram *Crassostrea spp.* e *Mytilus spp.*, sendo a ostra *Crassostrea gigas* e o mexilhão *Mytilus edulis* as espécies mais amplamente estudadas. Para descrever a microbiota, os tecidos mais analisados foram intestino, glândulas digestivas e brânquias; além da hemolinfa. Os filos mais presentes na microbiota de bivalves sob diferentes circunstâncias foram *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Tenericutes*.

Com relação aos fatores bióticos responsáveis por alterar a composição da microbiota de bivalves, destacaram-se os gêneros patogênicos para bivalves: *Vibrio*, *Aeromonas* e *Arcobacter*. A maioria dos patógenos relacionados à bivalves está associada, de fato, ao gênero *Vibrio*, tendo sua presença na microbiota relatada em 21 artigos. A dieta implementada aos cultivos também foi responsável por alterar a microbiota de bivalves, destacando-se principalmente o uso desaconselhável dos detritos unicelulares da alga *Porphyra spp.*, que induziram à mortalidade de ostras *C. gigas*. Dentre os fatores abióticos, a variação de temperatura e pH, além de contaminantes ambientais – corante azul, atrazina, glifosato, os metais Hg, Cu, As, Hg e Cr, e microplásticos – também alteraram a microbiota de bivalves; sobretudo por diminuir gêneros relacionados à imunidade do hospedeiro, e favorecerem o aumento de colônias de bactérias oportunistas, que podem levar à infecção em bivalves quando em sinergia com outros fatores.

Em suma, o estudo da microbiota de bivalves se mostrou um recurso promissor para o desenvolvimento de biotecnologias, como probióticos para a aquicultura. Considerando o potencial probiótico já amplamente utilizado na aquicultura de peixes e camarões, destacam-se os gêneros *Bacillus* (sobretudo *B. coagulans*) e *Lactobacillus*, experimentalmente observados em estudos com bivalves; além de outros gêneros de bactérias com potencial efeito probiótico em bivalves, que necessitam de maiores investigações para determinar a dosagem aconselhada: *Pseudoalteromonas*, *Endozoicomonas*, *Phaeobacter*, e outras citadas anteriormente.

Uma quantidade considerável de possíveis probióticos foi indicada por estudos que correlacionaram a composição da microbiota de bivalves à presença de contaminantes ambientais e/ou patógenos na área de coleta. Portanto, recomenda-se que mais estudos sobre a microbiota de bivalves utilizem esta linha de pesquisa, sendo uma ótima abordagem para a descoberta de possíveis probióticos para a aquicultura. Além disso, recomenda-se o aumento de estudos englobando espécies de bivalves de água doce, pois, atualmente, são escassos.

Referências

- AKHTER, N. et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology** [s. l.], v. 45, p. (733-741), junho, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26044743/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- ALMA, L. et al. Ocean acidification and warming effects on the physiology, skeletal properties, and microbiome of the purple-hinge rock scallop. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s. l.], v. 240, set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31536813/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- APPRILL, A. Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. **Frontiers in Marine Sciences**, [s. l.], v. 4, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00222/full>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- BEAUGRAND, G. et al. Reorganization of North Atlantic marine copepod biodiversity and climate. **Science**, [s. l.], v. 296, n. 5573, p. (1692–1694), maio 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12040196/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- BRIERLEY, A. S.; KINGSFORD, M. J. Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. **Current Biology**, [s. l.], v. 19, n. 14, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982209011816>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- BRITT, A. et al. The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32632188/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- BURIOLI, E. A. V. et al. First description of a mortality event in adult Pacific oysters in Italy associated with infection by a *Tenacibaculum soleae* strain. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. (215-221), fev, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28836671/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I. et al. Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: *Ostreidae*). **Revista de Biología Tropical**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 183–191, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21516645/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- DESRIAC, F. et al. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS): Microbiology Letters**, [s. l.], v. 350, n. 1, p. (107-116), jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286558/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. *Vibrio*–bivalve interactions in health and disease. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. (4323-4341), maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32363732/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- DONEY, S. C. et al. Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, [s. l.], v. 4, p. (11-37), jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22457967/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

DUBÉ, C. E.; KY, C. L.; PLANES, S. Microbiome of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*, a multi-tissue description with functional profiling. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. (1-17), jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31333634/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

FDHILA, K. et al. Culture conditions improvement of *Crassostrea gigas* using a potential probiotic *Bacillus sp* strain. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 110, p. (654-658), set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28710014/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

FERNÁNDEZ, N. T. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. (69–83), abr. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325323/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

FERNÁNDEZ, N. T. et al. Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 64, p. (555-569), mar. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22450510/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

GRIFFIN, T. W. et al. An examination of the use of antibiotics as a method to experimentally perturb the microbiota of suspension-feeding bivalves. **Invertebrate Biology**, [s. l.], v. 140, n. 4, p. (1-17), dez. 2021 (b). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ivb.12352>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

GRIFFIN, T. W.; BAER, J. G.; WARD, J. E. Direct Comparison of Fecal and Gut Microbiota in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Discourages Fecal Sampling as a Proxy for Resident Gut Community. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 81, p. (180–192), jul. 2021 (a). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32638043/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

HARVELL, C. D. et al. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. **Science**, [s. l.], v. 296, n. 5576, p. (2158-2162), jun. 2002. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1063699>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

HIGGINS, E.; PARR, T. B.; VAUGHN, C. C. Mussels and Local Conditions Interact to Influence Microbial Communities in Mussel Beds. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. (1-12), jan. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35095802/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

HORODESKY, A. et al. Metagenomic analysis of the bacterial microbiota associated with cultured oysters (*Crassostrea sp.*) in estuarine environments. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 92, p. (1–15), jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32609272/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

IANNELLO, M. et al. Long-lasting effects of chronic exposure to chemical pollution on the hologenome of the Manila clam. **Evolutionary Applications**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. (2864-2880), dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34950234/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

IORI, S. et al. The effects of glyphosate and AMPA on the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and its microbiota. **Environmental Research**, [s. l.], v. 182, mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31830695/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 344, n. 349, p. (29-34), 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848612001494>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KHAN, F. U. et al. Effects of Ocean Acidification, Hypoxia, and Warming on the Gut Microbiota of the Thick Shell Mussel *Mytilus coruscus* Through 16S rRNA Gene Sequencing. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 8, ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33175187/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KING, W. L. et al. Pearl Oyster Bacterial Community Structure Is Governed by Location and Tissue-Type, but *Vibrio* Species Are Shared Among Oyster Tissues. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. (1-11), ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34434182/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KING, W. L. et al. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. (1-12), mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32221598/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KUMAR, R.; DATTA, T. K.; LALITHA, K.V. *Salmonella* grows vigorously on seafood and expresses its virulence and stress genes at different temperature exposure. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 15, nov. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26531707/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KYU-SONG, S. et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. **Shellfish Immunology** [s. l.], v. 40, p. (40-48), junho, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24973515/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LATTOS, A. et al. Gut symbiotic microbial communities in the IUCN critically endangered *Pinna nobilis* suffering from mass mortalities, revealed by 16S rRNA amplicon NGS. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. (1-21), nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33260452/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LEITE, L. et al. Phylogenetic diversity and functional characterization of the Manila clam microbiota: a culture-based approach. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, p. (21.721-21.732), ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28766142/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LI, L.-L. et al. Impacts of microplastics exposure on mussel (*Mytilus edulis*) gut microbiota. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 745, nov. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720345472>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LI, Y.-F. et al. Characterization of Gut Microbiome in the Mussel *Mytilus galloprovincialis* in Response to Thermal Stress. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, ago. 2019 (a). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6714297/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LI, Y.-F. et al. Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilus coruscus*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, nov. 2019 (b). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31704981/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LOKMER, A.; WEGNER, K. M. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. **International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**, [s. l.], v. 9, p. (670–682), set. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4331581/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MALHAM, S. K. et al. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. **Aquaculture**, [s. l.], v. 287, n. 1-2, p. (128–138), fev. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848608007485>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MATHAI, P. P. et al. Influence of Environmental Stressors on the Microbiota of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 81, p. (1042–1053), 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-020-01642-2>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MCFALL-NGAI, M. et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. **PNAS**, [s. l.], v. 110, n. 9, p. (3229–3236), fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23391737/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MEISTERHANS, G. et al. Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the Organ Scale in Contrasting Sets of Individuals. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 71, p. (194–206), ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26311127/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MURPHY, A. E. et al. Bioreactivity and Microbiome of Biodeposits from Filter-Feeding Bivalves. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 77, p. (343–357), jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30612185/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MUSELLA, M. et al. Tissue-scale microbiota of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and its relationship with the environment. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 717, p. (1–9), maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32084687/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MYRAND, B.; GUDERLEY, H.; HIMMELMAN, J. H. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 197, p. (193–207), maio 2000. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/24855753>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

OLIVIER, A. V. D. S. et al. A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. (3–25), fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/raq.12301>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PACHEPSKY, Y. A. et al. Comparing temperature effects on *Escherichia coli*, Salmonella, and *Enterococcus* survival in surface waters. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. (278–283), set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739086/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PAILLARD, C. et al. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 73, p. (225–232), 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571318/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PATHIRANA, E. et al. The role of tissue type, sampling and nucleic acid purification methodology on the inferred composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) microbiome. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 127, n. 2, p. (429–444), ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102430/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PAVLINEC, Ž. et al. Assessment of predominant bacteria in noble pen shell (*Pinna nobilis*) collected in the Eastern Adriatic Sea. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 192, p. (1-10), ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32789571/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PEÑA, R. A.; MORALES, A. G.; ELIZONDO, G. R.; MENDOZA, C. G.; TOVAR, R. D.; ESCOBEDO, F. C. Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, p. (3481–3493), jun. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-020-02167-4>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E. Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) and the Blue Mussel (*Mytilus edulis*): Temporal Variation and the Influence of Marine Aggregate-Associated Microbial Communities. **mSphere**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. (1-17), dez. 2019. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00730-19>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E. Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family *Ostreidae*. **Journal of Shellfish Research: National Shellfisheries Association**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. (793-806), out. 2018. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/journal-of-shellfish-research/volume-37/issue-4/035.037.0410/Microbial-Ecology-of-the-Bivalvia-with-an-Emphasis-on-the/10.2983/035.037.0410.short>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PRADO, S.; ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 145, p. (187–197), 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851536/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

ROSSBACH, S. et al. Tissue-Specific Microbiomes of the Red Sea Giant Clam *Tridacna maxima* Highlight Differential Abundance of *Endozoicomonadaceae*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. (1-11), nov. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6901920/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

RUBIOLLO, J. A. et al. The impact of depuration on mussel hepatopancreas bacteriome composition and predicted metagenome. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 111, n. 7, p. (1117–1129), jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29340947/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SÁNCHEZ-ORTIZ, A. C. et al. Effect of mixed-*Bacillus spp* isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 59, p. (95-102), 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27744059/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SANTIBÁÑEZ, P. et al. First characterization of the gut microbiome associated with *Mytilus chilensis* collected at a mussel farm and from a natural environment in Chile. **Aquaculture**, [s. l.], v. 548, n. 1, p. (1-9), fev. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848621013077>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

- SCANES, E. et al. Climate change alters the haemolymph microbiome of oysters. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 164, mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33485019/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- SCHILL, W. B.; IWANOWICZ, D.; ADAMS, C. *Endozoicomonas* Dominates the Gill and Intestinal Content Microbiomes of *Mytilus edulis* from Barnegat Bay, New Jersey. **Journal of Shellfish Research**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. (391-401), ago. 2017. Disponível em: <<https://pubs.usgs.gov/publication/70192268>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- SILVA DOS SANTOS, F. et al. Evaluation of the immune responses of the brown mussel *Perna perna* as indicators of fecal pollution. **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 80, p. (115–123), 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29864586/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- SINGH, Y. et al. Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 12, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23694677/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- THEERACHAT, M.; GLINWONG, C. CHULALAKSANANUKUL, W. Dataset of blood cockle (*Anadara granosa*) microbiota from coastal areas and earthen-pond farms around the upper Gulf of Thailand. **Data in Brief**, [s. l.], v. 30, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215305/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- UTERMANN, C. et al. Combined genotyping, microbial diversity and metabolite profiling studies on farmed *Mytilus spp.* from Kiel Fjord. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, p. (1-13), maio 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-26177-y>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- VALENZUELA, T. et al. 16S rRNA–based analysis reveals differences in the bacterial community present in tissues of *Choromytilus chorus* (*Mytilidae*, bivalvia) grown in an Estuary and a bay in southern Chile. **Diversity**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. (1-17), maio 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-2818/13/5/209>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- VAUGHN, C. C.; HOELLEIN, T. J. Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, [s. l.], v. 49, p. (183-208), 2018. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062703>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- VEZZULLI, L. et al. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 75, p. (495–504), ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28803409/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- VEZZULLI, L. et al. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the *vibrios*. **International Society for Microbial Ecology**, [s. l.], v. 6, p. (21-30), jul. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21753799/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- WATHSALA, R. H. G. R. et al. Variability of metabolic, protective, antioxidant, and lysosomal gene transcriptional profiles and microbiota composition of *Mytilus galloprovincialis* farmed in the North Adriatic Sea (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 172, p. (1-10), nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34399278/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

ZANNELLA, C. et al. Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 15, n. 182, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5484132/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

ZHANG, L. et al. Impact of ocean acidification on physiology and microbiotain hepatopancreas of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Oceanology and Limnology**, [s. l.], v. 40, p. (620-633), dez. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00343-021-0462-x>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

ZHAO, W. et al. The Probiotic Bacterium *Phaeobacter inhibens* Downregulates Virulence Factor Transcription in the Shellfish Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by N-Acyl Homoserine Lactone Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 2, p. (1-14), jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30389771/>>. Acesso em: 19 nov. 2023.