



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de  
Ambientes Aquáticos Continentais



**Impacto da contaminação ambiental na microbiota  
intestinal de peixes *Phalloceros caudimaculatus*.**

**Christian Deyvis Nolorbe Payahua**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Zanette  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Wurdig Roesch

Rio Grande  
2019



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de Ambientes  
Aquáticos Continentais



## **Impacto da contaminação ambiental na microbiota intestinal de peixes *Phalloceros caudimaculatus*.**

**Aluno:** Christian Deyvis Nolorbe Payahua

**Orientador:** Dr. Juliano Zanette

**Co-orientador:** Dr. Luiz Fernando Wurdig Roesch

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

À Organização dos Estados Americanos (OEA), Programa de Alianças Estratégicas para Educação e Capacitação (PAEC) e Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB).

Ao meu orientador Juliano Zanette por confiar no meu trabalho.

Ao meu coorientador Professor Luiz F. W. Roesch pelo grande apoio na análise de dados.

À Anderson Freitas, Beatriz Midori e Priscila Dobbler pela ajuda na realização dos experimentos nos laboratórios da UNIPAMPA, campus São Gabriel

À Gionara Tauchem Diretora de Pós-Graduação pelo apoio incondicional.

A todos os demais colegas do laboratório do ICB pelo incentivo ao trabalho e pelo incrível carinho que vocês me deram.

Aos meus pais e a todos os amigos que eu fiz durante meu mestrado, muito obrigado pelo amor e afeto.

## **Apresentação**

O trabalho apresentado aqui está dividido em três segmentos, sendo o primeiro uma introdução geral sobre o tema proposto, seguido dos objetivos e as referências utilizadas. O segundo segmento é representado pelo manuscrito intitulado “**Environmental contamination alters the intestinal microbial community of guppy fish populations**”, que será submetido na revista *Science of the Total Environment*, e o terceiro por fim, pelas considerações finais.

## SUMÁRIO

1.	RESUMO.....	8
2.	ABSTRACT.....	9
3.	INTRODUÇÃO GERAL.....	10
3.1	Ecosistemas aquáticos continentais e contaminação ambiental.....	10
3.2	Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos (HPAs).....	13
3.3	Biomonitoramento e <i>Phalloceros caudimaculatus</i> como modelo ecotoxicológico.....	15
3.4	Microbiota intestinal nos peixes.....	19
3.5	Biomarcadores microbianos.....	21
3.6	<i>Metabarcoding</i> bacteriano.....	22
4.	OBJETIVO.....	24
5.	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	25
6.	MANUSCRITO: Environmental contamination alters the intestinal microbial community of the livebearer killifish <i>Phalloceros caudimaculatus</i> .....	34
	Abstract.....	35
1.	Introduction.....	36
2.	Materials and methods.....	37
2.1.	Sampling, selection and site characterization.....	37
2.2.	Microbial DNA extraction, 16S rRNA gene amplification and sequencing.....	37
2.3.	16S Sequence processing for downstream analyses.....	38
2.4.	Statistical analysis of data.....	39
3.	Results.....	40
3.1.	Microbiota composition in the gut and the OTUs shared between the <i>P. caudimaculatus</i> populations.....	40
3.2.	Decreased microbial diversity and the possible influence of the environmental contaminants in microbial communities.....	41
3.3.	Microbial OTUs correlated with exposure to environmental contaminants.....	41
4.	Discussion.....	42
4.2.	Anthropic contamination causes loss of microbial diversity.....	44
4.3.	Potential microbial biomarkers of environmental contaminants.....	46
5.	Conclusion.....	47
	References.....	48
	FIGURE CAPTIONS.....	57
	Highlights.....	63
	Graphical abstract.....	63

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
ANEXOS 1 .....	65

### Lista de figuras da introdução geral

<b>Figura 1.</b> Locais na cidade do Rio Grande. As barrar representam os níveis de Hopano e Alquilbenzeno em sedimentos segundo Medeiros et al. (2005). .....	11
<b>Figura 2.</b> Fontes naturais e antropogênicas de HPA. Adaptado de Abdel-Shafy and Mansour (2016).....	14
<b>Figura 3.</b> Distribuição, habitat e reprodução de algumas espécies de Cyprinodontiforme estudados na América do Norte e América do Sul. O <i>Phalloceros caudimaculatus</i> (círculo vermelho) foi empregado como modelo para nosso estudo. Adaptado de Zanette (2013). .....	17
<b>Figura 4.</b> Guarú <i>Phalloceros caudimaculatus</i> . O padrão de coloração varia entre as populações geográficas. A mancha lateral está muito frequente e presente, entretanto, pode estar ausente. A) macho (24,5 mm SL) com gonopodium (círculo vermelho); B) fêmea (36,8 mm SL) com papila urogenital reta (círculo amarelo) localizada entre o ânus e a base do primeiro raio da nadadeira anal (Lucinda, 2008 .....	18
<b>Figura 5.</b> Distribuição de <i>Phalloceros caudimaculatus</i> na América do Sul. <i>P. caudimaculatus</i> está distribuída desde o sudeste do Brasil até o norte do Uruguai e Argentina (círculo vermelho, 6), outras espécies de <i>Phalloceros</i> (1 a 5). Adaptada de Lucinda (2008).....	19

### Lista de figuras do manuscrito

<b>Fig. 1.</b> Study area. Sampling sites of <i>Phalloceros caudimaculatus</i> in the polluted stream (POL, red point) and the reference stream (REF, green point) in the city of Rio Grande, RS, Brazil. The POL site is located between a highly urbanized area and an industrial area (gray area). .....	57
<b>Fig. 2.</b> Microbiota composition of <i>P. caudimaculatus</i> populations. Bar graphs OTUs-based showing: A. Relative abundance of bacterial phyla in the intestinal microbiota of each fish. B. Relative abundances at genera level of each <i>P. caudimaculatus</i> fish. We Analyzed samples both the reference stream (R1 – R16, green color) as polluted stream (P1-P15, red color).....	58
<b>Fig. 3.</b> Core microbiota. Heatmap showing the prevalence of the microbiota taxa in the gut of <i>Phalloceros caudimaculatus</i> that presented the detection threshold (relative abundance, %) equal or higher than 0.001. The prevalence varies from 0 % (blue, value <sub>min</sub> = 0.0) to 100 % (red, value <sub>máx</sub> = 1.0) in the gut samples (n= 31 fish total).....	59

**Fig. 4.** Alpha diversity of the two *P. caudimaculatus* population. Observed diversity = total number of OTUs observed ( $p=0.0028$ ), and Shannon diversity ( $p=0.0082$ ). The boxes cover the first to the third quartile; the horizontal line inside the boxes represents the median. Whiskers extending vertically from the boxes indicate variability outside the upper and lower quartiles, the single red and blue circles indicate outliers. .... 60

**Fig. 5.** Comparisons of microbial communities based on principal coordinate analysis (PCoA) by distance metrics of binary distances metrics (A) and Bray-Curtis(B). Each point represents a microbial community and the blue and red points represent the reference and polluted streams, respectively. Closer points represent similar microbial communities, while the more distant points represent different microbial communities. It was tested the statistical significance of the groupings of samples with the Adonis function, using the distance matrices. The R2 values were 0.468 ( $p = 0.001$ ) for binary distance metrics and 0.095 ( $p = 0.01$ ) for Bray-Curtis distance metrics..... 61

**Fig. 6.** Microbial Biomarkers. The most important bacterial genera for the prediction of microbial biomarkers for characterization of streams according to the analysis of Random Forests. Higher values of mean decrease in accuracy indicate OTUs that are more important to the classification. All OTUs with an importance score  $>0.001$  are listed. .... 62

## 1. RESUMO

Os riachos são receptores de esgotos urbanos e efluentes industriais. Estes resíduos contêm uma mistura de contaminantes que podem causar alterações fisiológicas e comportamentais nos organismos aquáticos. No presente trabalho foi examinado o impacto da mistura dos contaminantes ambientais na microbiota intestinal de peixes. O peixe guarú *Phalloceros caudimaculatus* foi usado como modelo de estudo por ser uma espécie abundante, cosmopolita e facilmente encontrada em riachos com diferentes perfis de contaminação antrópica no Sul do Brasil. Usando análises metagenômicas foi sequenciado o gene 16S rRNA, caracterizado e comparada as comunidades bacterianas intestinais dos peixes guarús provenientes de um riacho urbano e peri-urbanos. Os resultados indicaram que a microbiota dos guarús foi dominada pelos filos Proteobacteria e Firmicutes. Foram identificadas 42 unidades taxonômicas operacionais (*OTUs*) bacterianas das quais o gênero *Burkholderia* foi mais predominante com mais dos 35 % da abundância total em todas as amostras. Foi demonstrado que a "microbiota núcleo" de *P. caudimaculatus* é formada por 13 *OTUs* que apresentam uma alta prevalência (> 90%) e foram compartilhadas em todos os indivíduos estudados. Foi encontrada uma baixa diversidade (Shannon e *OTUs* observada) e alteração nas comunidades bacterianas intestinais (PERMANOVA) associada com a contaminação ambiental presente no riacho poluído. Foi identificada uma forte associação entre a contaminação ambiental e as *OTUs* *Methylocaldum* e *Rhodobacter* presente no intestino dos peixes residentes no riacho poluído. As *OTUs* poderiam ser usadas como potenciais biomarcadores microbianos de exposição a contaminantes ambientais. Os contaminantes ambientais causaram perda da diversidade e alterações na microbiota intestinal dos peixes. O estudo sugere que os impactos antrópicos podem causar alterações em biomarcadores microbianos intestinais em peixe.

**Palavras-chave:** Poluição, *Phalloceros caudimaculatus*, microbiota intestinal, *metabarcoding*, biomarcadores, 16S rRNA.



## 2. ABSTRACT

The streams are receivers of sewage and industrial effluents. These residues contain a mixture of contaminants that could cause physiological and behavioral alteration in aquatic organisms. This study evaluates the impact of mixing environmental contaminants on the intestinal microbiota of fish. The guppy fish *Phallocerus caudimaculatus* was used as a model because it is an abundant species, cosmopolitan and easy to find in streams with different profiles of anthropogenic contamination in southern Brazil. Using metagenomic analyzes, we sequenced 16S rRNA gene, characterized and compared the intestinal microbiota of guppy fish from an urban and a peri-urban stream. The results indicated that gut microbiota was dominated by the phyla Proteobacteria and Firmicutes. It was possible to identify 42 bacterial operational taxonomic units (OTUs) of which the *Burkholderia* genus was more prevalent with more than 35% of total abundance in all samples. It was found a low diversity (Shannon and OTUs observed) and alteration in the intestinal bacterial communities (PERMANOVA) associated with the environmental contamination in the polluted stream. It was identified a strong association between environmental contamination and the OTUs *Methylocaldum* and *Rhodobacter* present in the gut of fish resident in the polluted stream. Those OTUs could be used as potential microbial biomarkers of exposure to environmental contaminants. Environmental contaminants cause loss of diversity and changes in the intestinal microbiota of fish. In addition, we showed that the negative effects of anthropogenic contaminants could be measured through new microbial biomarkers in the gut.

**Keywords:** Pollution, *Phallocerus caudimaculatus*, Gut microbiota, metabarcoding, biomarkers, 16S rRNA.

### 3. INTRODUÇÃO GERAL

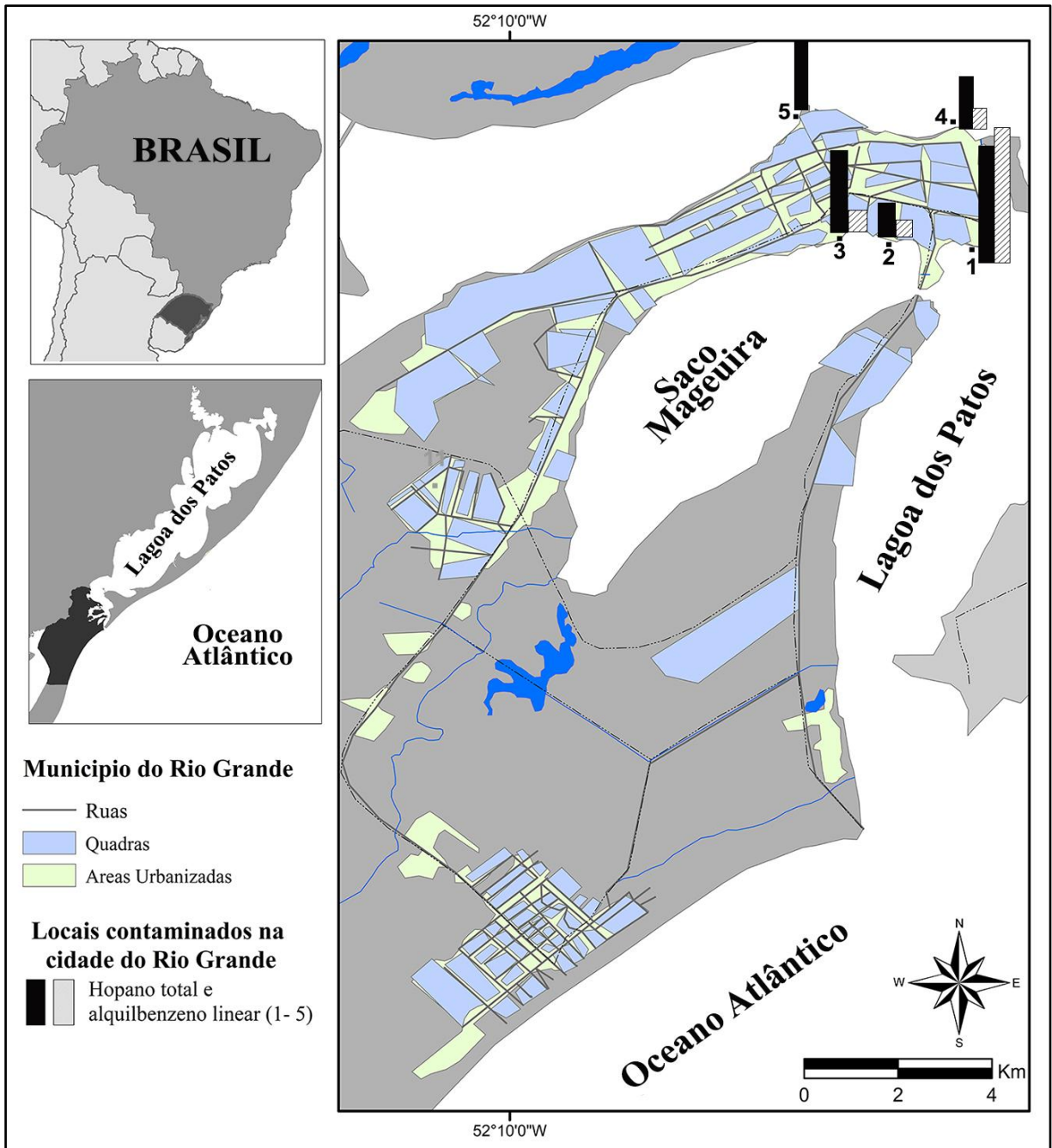
#### 3.1 Ecossistemas aquáticos continentais e contaminação ambiental.

Ecossistemas aquáticos continentais são ambientes com uma alta taxa de absorção e transformação de matéria pelos organismos, processos biogeoquímicos dinâmicos, além de elevada produção primária, geralmente com uma salinidade muito menor em comparação às águas marinhas (Esteves, 2011). Dentre os recursos hídricos pertencentes a esses ecossistemas aquáticos, incluem-se águas com diferentes dimensões e graus de salinidade. Esses ecossistemas apresentam regimes de inundações permanentes (áreas sempre alagadas) ou intermitentes (áreas alagadas apenas em alguns períodos) (Maltchik *et al.*, 2004). Os ambientes aquáticos continentais são áreas muito produtivas que contém uma alta diversidade biológica de diferentes comunidades, sendo uma delas os peixes. Estima-se que aproximadamente 43 % das espécies de peixes conhecidos no planeta estão presentes nas águas continentais (Esteves, 2011). Assim, a manutenção e conservação desses ecossistemas são indispensáveis para proteção da biodiversidade, e para o fornecimento de água de boa qualidade para o homem (Vörösmarty *et al.*, 2010).

O estado do Rio Grande do Sul, de acordo ao Decreto nº 53.885/2017 da Secretaria do Meio ambiente, possui três regiões Hidrográficas bem definidas: região do rio Uruguai, região do Guaíba e região do Litoral. Também, abriga 3 441 zonas úmidas onde aproximadamente 72% do total dessas áreas apresentam uma área menor que 1 km<sup>2</sup> (Maltchik, 2003; Maltchik *et al.*, 2004). As áreas úmidas são corpos da água que apresentam um regime de alagamento permanente ou temporário (Rolon *and* Maltchik, 2006) com um papel muito importantes na conservação da biodiversidade (Getzner, 2002). Além das áreas úmidas, o estado alberga o sistema da Lagoa dos Patos, considerado a maior lagoa costeira do mundo (Kjerfve, 1986). A Lagoa dos Patos é um estuário considerado muito importante da zona costeira do Brasil, esses ecossistemas são zonas de transição que apresentam ambientes muito produtivos em diversidade de espécies (Kennish, 2002).

O estuário da Lagoa dos Patos é receptor de vários de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, especialmente das cidades de Rio Grande, Pelotas e São José do Norte (Odebrecht *et al.*, 2010). O incremento das atividades industriais, navios e portuárias nos últimos anos levaram à avaliação de diferentes compartimentos ambientais (solo, sedimento e água), os resultados mostraram uma considerável contaminação orgânica ao redor da cidade

(Medeiros *et al.*, 2005, Chivittz *et al.*, 2016) (Figura 1). Estudos recentes (Chivittz *et al.*, 2016, Ferreira *et al.*, 2016) de avaliações ambientais na cidade de Rio Grande na coluna da água e nos sedimentos que fluem até o estuário foram realizados em diferentes pontos das cidades para identificar as maiores concentrações dos contaminantes orgânicos em relação às mudanças no perfil industrial e urbano da cidade.



**Figura 1.** Locais na cidade do Rio Grande. As barras representam os níveis dos marcadores de contaminação orgânica Hopano e Alquilbenzeno em sedimentos (adaptado de Medeiros *et al.*, 2005).

A poluição é considerada um tipo de estressor ambiental, e pode ser definida como a presença de componentes ou fatores químicos, físicos ou biológicos que tornam um corpo de água prejudicial para os organismos (Schweitzer *and* Noblet, 2018). A contaminação dos ecossistemas aquáticos é uma grande preocupação na atualidade, devido à presença de uma grande variedade de substâncias tóxicas geradas pelo homem. Dentre estas, os metais pesados, microplásticos, produtos de cuidado pessoal e produtos farmacêuticos chegam aos corpos da água através de fontes pontuais e difusas (Harikishore, 2017). O lançamento dos resíduos antrópicos pode incrementar a quantidade de nutrientes presentes nesses corpos de água, causando alterações ecológicas e biológicas. O enriquecimento de nutrientes de um ecossistema provoca alteração no seu funcionamento e redução da biodiversidade (Isbell *et al.*, 2013; O'Connor *et al.*, 2015). A eutrofização e hipóxia são alterações relacionadas com o aumento das concentrações de nutrientes, como Nitrogênio e Fósforo nos ambientes aquáticos (Dutton *et al.*, 2018). As descargas antrópicas são importantes abastecedores de nutrientes nos ambientes aquáticos que geralmente podem causar eutrofização artificial (Esteves, 2011). Além disso, estas descargas contêm uma mistura de contaminantes de uso pessoal, como estrogênios e mimetizadores de estrogênio, com potencial de causar efeitos reprodutivos em peixes (Kidd *et al.*, 2007).

Em países como China e EUA há medidas para combater a poluição das águas causada pelo desenvolvimento humano. Nos EUA, é considerado um crime ambiental a desorganização ecológica e a poluição da água causadas pelas emissões das instalações de tratamento público (Lynch *et al.*, 2017). A China encontra-se em estado crítico, porque passou por um desenvolvimento industrial exacerbado e a uma escassez da água (Hu *and* Cheng, 2013). Devido a isso, a China criou um plano da “guerra contra a poluição”, com objetivo de recuperar os ecossistemas aquáticos que estão poluídos pelos resíduos antrópicos (Han *et al.*, 2016).

Em alguns países, como no Brasil, por exemplo, é permitido descartar legalmente certas quantidades de contaminantes nos riachos após tratamento, mas estas emissões são pouco fiscalizadas para os ecossistemas aquáticos urbanos. No Brasil o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/2005) determinou alguns limites para despejo de contaminantes que alteram os ecossistemas aquáticos. Mas falta reavaliar os limites estabelecidos pelo CONAMA 357/2005, já que, existe perda da biodiversidade mesmo dentro dos limites impostos pela legislação ambiental nacional (Firmiano *et al.*, 2017). A cidade de Rio Grande,

no Rio Grande do Sul, é conhecida pelo desenvolvimento portuário, e como consequência, apresenta elevado índices de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em muitos lugares próximos a postos de combustíveis, refinaria e à área portuária (Garcia *et al.*, 2010).

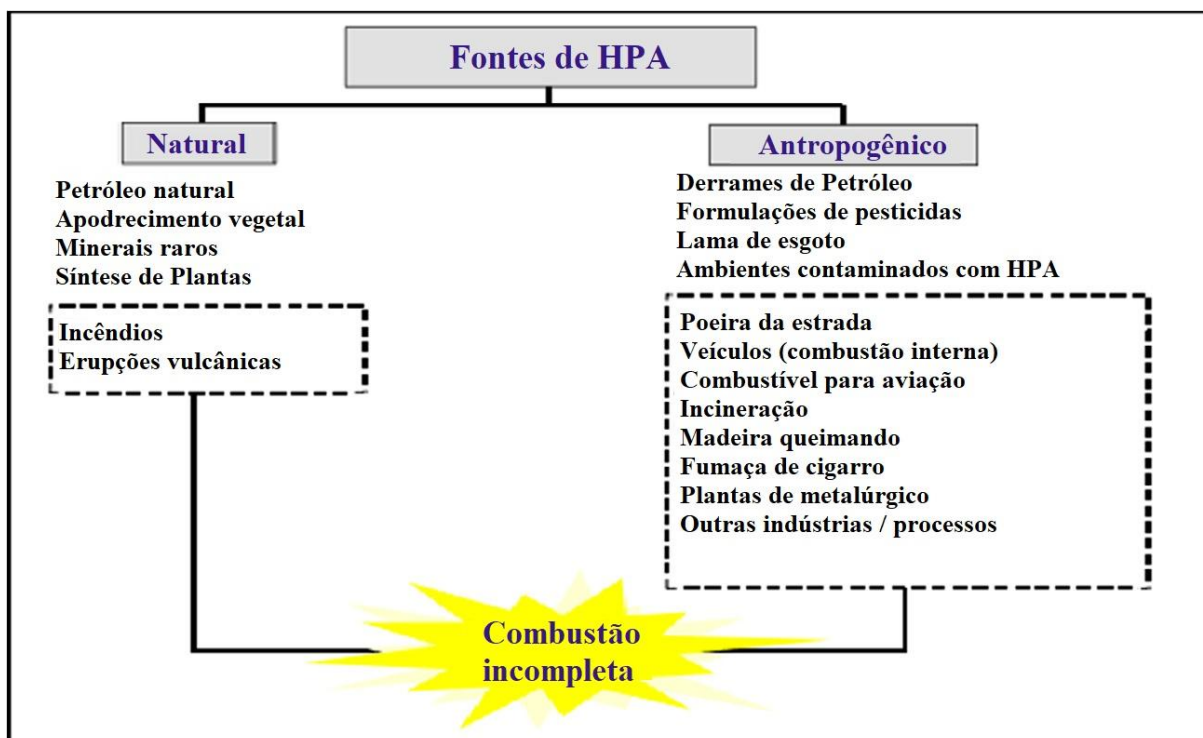
### 3.2 Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos (HPAs)

Os ambientes aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes antrópicos. O lançamento incontrolado dos resíduos antrópicos levou ao incremento de muitos poluentes, como os HPA no sedimento de muitos corpos de água perto das cidades (Garcia *et al.*, 2010). O termo HPA refere-se a compostos químicos aromáticos constituídos de carbono e hidrogênio que contem dois ou mais anéis benzênicos em sua estrutura (Pereira Netto *et al.*, 2000). A maioria dos HPAs são contaminantes orgânicos “semivoláteis” (Schweitzer and Noblet, 2018) e com maior solubilidade que outros Hidrocarbonetos (McAuliffe, 1987). Outra característica de alguns HPA é que o grau de toxicidade vai depender da salinidade. Assim em ecossistemas aquáticos com baixa salinidade os HPA tendem a ser mais solúveis, portanto mais tóxicos para os organismos (Ramachandran *et al.*, 2006).

Os HPA são amplamente detectados no ar, solo e água, portanto, são considerados ubíquos (Menzie *et al.*, 1992). A *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos mostra uma lista de 16 HPA como contaminantes prioritários: acenafteno, acenaftileno, antraceno, fluoranteno, flúor, naftaleno, fenantreno, pireno, benzo [*a*] antraceno, benzo [*b*] fluoranteno, benzo [*k*] fluoranteno, benzo [*g, h, i*] perileno, benzo [*a*] pireno, criseno, dibenzo [*a, h*] antraceno, *e* indeno [1,2,3-*cd*] pireno. Esses HPA são considerados possíveis ameaças para a saúde dos organismos devido a seu potencial carcinogênico, imunotóxico e genotóxico (Mumtaz *et al.*, 1996).

Os HPAs representam risco para o meio ambiente e organismos e a fonte desses contaminantes pode ser natural ou antropogênica (Figura 2). Suas três fontes principais para o meio ambiente são: pirogênico (derivados da combustão), petrogênico (derivados do petróleo) e biológico (sínteses de plantas e bactérias ou degradação de vegetais) (Abdel-Shafy; Mansour, 2016). Para os ecossistemas aquáticos as fontes dos HPA são efluentes industriais e urbanos, atividades de transporte, derrames de petróleo, queima de combustíveis fósseis e afloramentos naturais (Medeiros *et al.*, 2005). Quanto maior são as atividades antrópicas industriais maior é o incremento dos HPA no corpo da água. Portanto, é comum que os locais

que estão próximos das indústrias apresentem maiores concentrações dos HPA que outros lugares (Garcia *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Fontes naturais e antropogênicas de HPA. Adaptado de Abdel-Shafy and Mansour (2016).

Nas zonas urbanas os veículos automotores, as atividades industriais e a queima de carvão são os principais responsáveis pelo incremento dos HPAs no solo (Nganje *et al.*, 2012, Tang *et al.*, 2005; Vane *et al.*, 2014). Os HPAs têm ganhado importância nos últimos anos, não só pelo incremento das concentrações na coluna da água e no sedimento, mas também, pelo efeito nos organismos (Mumtaz *et al.*, 1996). Os HPAs são considerados como uma classe de carcinógenos ambientais generalizados capazes de induzir mutações e oncogênese (Baird *et al.*, 2005). Existe uma relação causa-efeito dos HPAs em organismos aquáticos, onde se demonstram formações de adutos de DNA e lesões hepáticas neoplásicas (Myers *et al.*, 2003). Outro fator que pode magnificar o potencial dano ao ecossistema aquático é a mistura dos HPA com outros poluentes (Engraff *et al.*, 2011). Essa combinação ocorre de forma ubíqua nos ambientes aquáticos e seus efeitos são mais do que aditivos (Gauthier *et al.*, 2014). A contaminação binária dos HPAs com metais, por exemplo, pode causar sérios problemas na saúde dos organismos (Muthusamy *et al.*, 2016).

Os HPAs têm muitos efeitos negativos nos organismos (Pereira Netto *et al.*, 2000) e seu destino dentro de um ecossistema aquático vai depender de muitos processos. Os processos de transporte, dispersão e transformação determinam o destino dos contaminantes dentro do organismo receptor (Holt, 2000). Os contaminantes dispersos dentro do corpo de água interagem com os organismos receptores, o que explicaria sua fácil absorção e distribuição. Os HPAs são encontrados no sedimento, coluna d'água e nos diferentes tecidos dos peixes (Asagbra *et al.*, 2015).

A toxicidade dos HPAs em peixes é atribuída em parte à indução da enzima citocromo P450 1A (CYP1A), e portanto, esta proteína tem sido utilizada como biomarcadora de contaminação ambiental (Aas *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2016). Nos organismos vivos, os HPA sofrem processos de absorção e posteriormente processo de biotransformação (Aas *et al.*, 2001). O processo de biotransformação dos HPA acontece no fígado em duas fases: a fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise dos HPA, catalisadas pelas enzimas citocromo P450, podendo gerar metabólitos altamente reativos, como os epóxidos, e a fase II catalisa reações de conjugação de moléculas endógenas (glutathione + moléculas de HPA) (Livingstone, 1998). Dessa forma, o composto se torna mais hidrofílico o que facilita sua secreção para a vesícula biliar, para que posteriormente sejam excretados (Fenet *et al.*, 2006; Mumtaz *et al.*, 1996).

Os contaminantes podem ser absorvidos de forma passiva ou ativa dependendo das propriedades do contaminante. A absorção passiva ocorre através da pele e/ou brânquias, enquanto a absorção ativa ocorre através do trato digestivo (Holt, 2000). Os peixes absorvem os HPAs através de suas brânquias, da superfície corporal ou pela ingestão de comida ou sedimentos contaminados (Vuorinen *et al.*, 2006). Uma vez dentro do corpo dos peixes os HPAs são distribuídos, metabolizados e transformados em compostos mais hidrofílicos e de fácil excreção (Beyer *et al.*, 2010).

### **3.3 Biomonitoramento e *Phalloceros caudimaculatus* como modelo ecotoxicológico.**

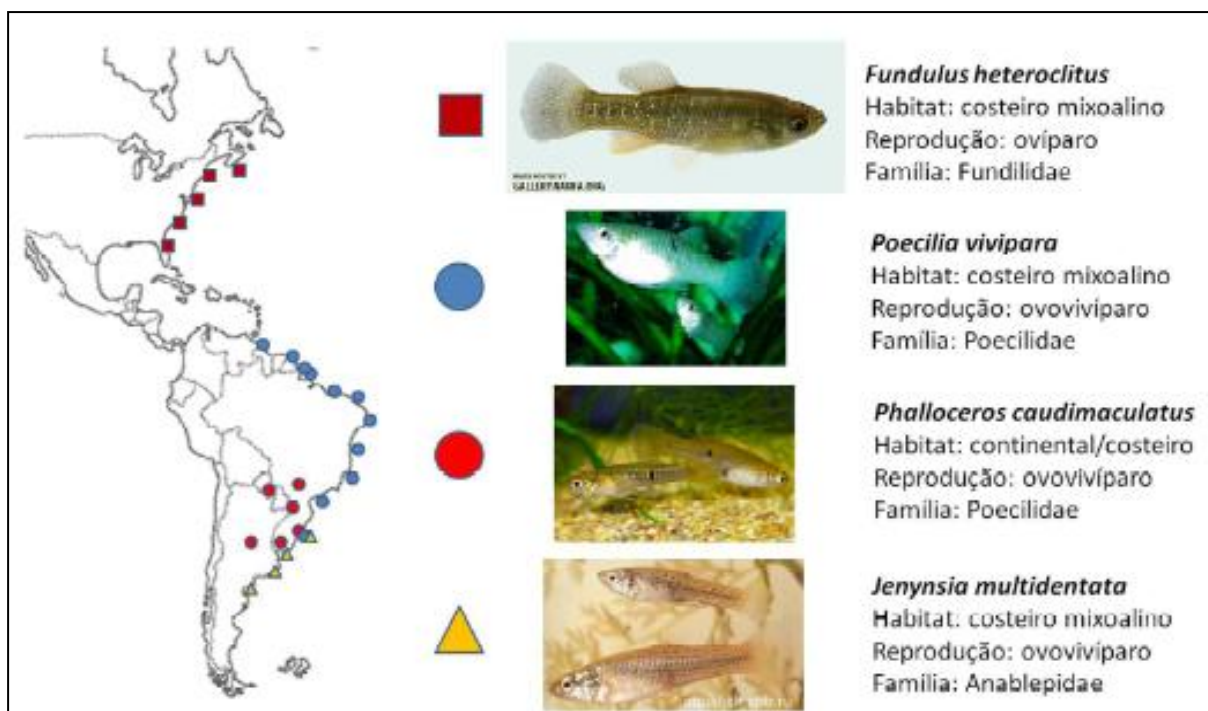
As espécies monitoras são aquelas que auxiliam na avaliação de impacto ambiental através de uma deficiência da sua função/desempenho (Beeby, 2001). Do ponto de vista histórico, o monitoramento ambiental era inicialmente focado na detecção de contaminantes em compartimentos de meios aquáticos, na coluna da água e no sedimento (Van der Oost *et al.*, 2003). Depois, a avaliação era feita pela presença de contaminantes em elementos bióticos

(Schmitt *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999). O biomonitoramento é uma boa ferramenta que nos ajuda a identificação de poluentes capazes de causar danos ao ambiente e a saúde humana (Da Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, 2003). A informação proporcionada pelo monitoramento biológico vem sendo usada em programas de melhoria da qualidade ambiental (Guimarães *et al.*, 2004; Suyama *et al.*, 2002). O monitoramento biológico pode ser classificado como ativo ou passivo (Besse *et al.*, 2013). O biomonitoramento passivo utiliza organismos nativos do local de estudo, enquanto o ativo permite a utilização de organismos transplantados de locais de referência para o local de interesse (Andral *et al.*, 2004; Benedicto *et al.*, 2011; Sudaryanto *et al.*, 2002).

Segundo Beeby (2001), uma espécie é indicadora quando indica a poluição através de sua ausência e abundância. Por outro lado, uma espécie é considerada monitora, quando indica o impacto através da deterioração de seu funcionamento ou desempenho. Portanto os monitores são usados com o propósito de monitorar ecossistemas e analisar os efeitos dos contaminantes nos organismos. As pesquisas usam diversos organismos biomonitores modelos, como por exemplo, invertebrados e peixes (Meador *and* Frey, 2018; Waite *and* Van Metre, 2017). Entre esses organismos destacam-se os peixes, pois apresentam uma alta sensibilidade a múltiplos distúrbios antropogênicos e mudanças nos ambientes aquáticos (Ndiaye *et al.*, 2012; Siroká *and* Drastichová, 2004).

Os peixes são bons modelos para estudos ambientais particularmente relacionados com a poluição, esses organismos respondem rapidamente a estressores naturais e antrópicos (Cossins *and* Crawford, 2005). Entre os grupos que destacam em estudos ecotoxicológicos podemos encontrar alguns membros da ordem Cyprinodontiformes (Clark *and* Di Giulio, 2012; Li *et al.*, 2018). A ordem Cyprinodontiformes é subdividida em dez famílias, das quais se observa uma alta abundância da família Poeciliidae no estado do Rio Grande do Sul. Os poecilídeos costumam habitar pequenas áreas com baixa profundidade (Maltchik *et al.*, 2014). Alguns membros da família Poeciliidae, como *Phalloceros caudimaculatus*, estão distribuídas na América do Sul (Froese *and* Pauly, 2019) (Figura 3).





**Figura 3.** Distribuição, habitat e reprodução de algumas espécies de Cyprinodontiforme estudados na América do Norte e América do Sul. O *Phalloceros caudimaculatus* (círculo vermelho) foi empregado como modelo para nosso estudo. Adaptado de Zanette (2013).

Atualmente diferentes espécies da família Poeciliidae são usadas como modelos em estudos toxicológicos em diferentes países (Bao *et al.*, 2018; Schmitter-Soto *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2014). Os poecilídios ou guarús são peixes de porte pequeno, onívoros, ovovivíparos, com fecundação interna, normalmente as fêmeas são maiores que os machos, estes apresentam a nadadeira anal modificada com presença de gonopodium. Também, apresentam certa tolerância às oscilações de salinidade e temperatura (Betito, 2006) (Figura 4).

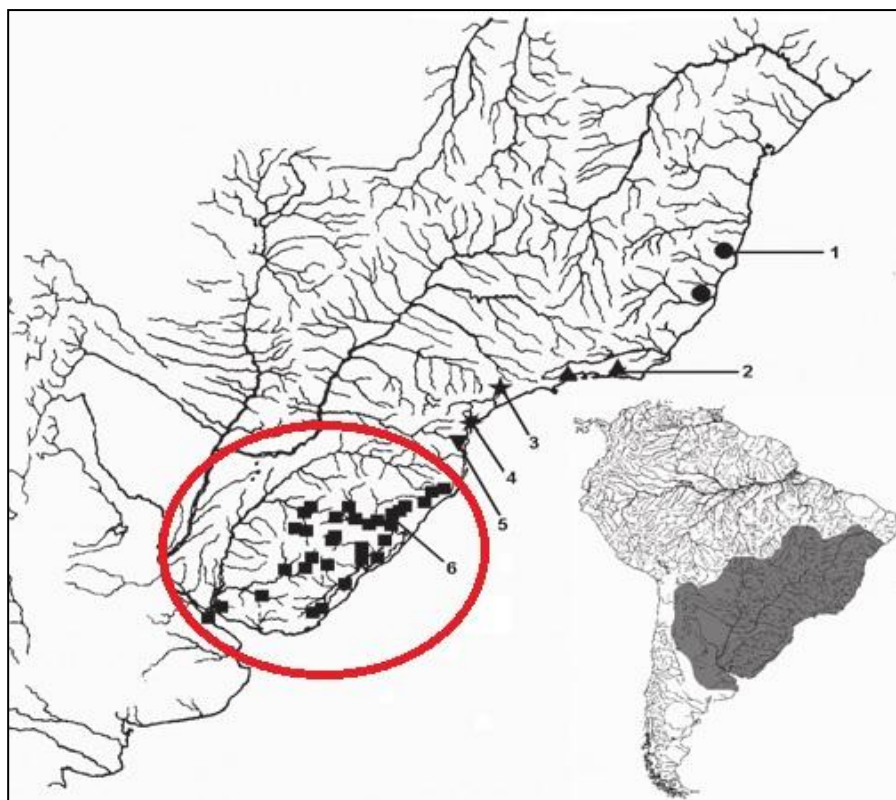
Alguns Poeciliidae são conhecidos por ter capacidade de se propagar em condições ambientais adversas, como *Phalloceros caudimaculatus*, os quais podem ser utilizados como monitores biológicos. Esta espécie tem a capacidade de colonizar as zonas impactadas por efluentes industriais e domésticos, caracterizando-a como uma espécie oportunista (Araújo *et al.*, 2009). No Brasil, especialmente na região Sul do Rio Grande do Sul que conta com aproximadamente com 3 441 áreas úmidas o *P. caudimaculatus* é a espécie mais abundantes (Maltchik *et al.*, 2014). O *P. caudimaculatus* podem estar presentes tanto em algumas áreas estuarinas durante o inverno (Betito, 2006), quanto nos riachos peri-urbanos da cidade de Rio Grande do Sul em todas as épocas do ano (Ferreira *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Guarú *Phalloceros caudimaculatus*. O padrão de coloração varia entre as populações geográficas. A mancha lateral está muito frequente e presente, entretanto, pode estar ausente. A) macho (24,5 mm SL) com gonopodium (círculo vermelho); B) fêmea (36,8 mm SL) com papila urogenital reta (círculo amarelo) localizada entre o ânus e a base do primeiro raio da nadadeira anal (Lucinda, 2008).

A espécie *P. caudimaculatus* está distribuída na área continental e costeira do sudeste do Brasil até o norte da Argentina (Froese and Pauly, 2019), especificamente pelo sistema Laguna dos Patos, parte inferior do rio Uruguai, drenagem do rio Tramandaí, drenagem do rio Mampituba e drenagens costeiras do Uruguay e Argentina (Lucinda, 2008) (Figura 5).

Estudos recentes realizados no Brasil mostraram que *P. caudimaculatus* pode ser usado como um bom modelo para estudos toxicológicos. Esta espécie responde de maneira positiva quando está exposta a diferentes xenobióticos demonstrando seu potencial para ser usados como biomonitor de ambientes contaminados por HPAs (Chivittz *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2016). Muitos organismos estão sendo expostos a certas classes de contaminantes, portanto é importante encontrar modelos biológicos que ajudem antecipar mudanças em níveis mais elevados de organização biológica. Os biomarcadores servem como um alerta precoce que nos permite tomar medidas de biorremediação antes de ocorrer mudanças irreversíveis no ecossistema (Cajaraville *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Distribuição de *Phalloceros caudimaculatus* na América do Sul. *P. caudimaculatus* está distribuída desde o sudeste do Brasil até o norte do Uruguai e Argentina (círculo vermelho, 6). Outras espécies de *Phalloceros* podem ser encontradas em outras regiões geográficas (1 a 5). Adaptada de Lucinda (2008).

### 3.4 Microbiota intestinal nos peixes

Chama-se microbiota a toda assembléia de microrganismos atribuídos a bactérias, arqueia ou eucariotas inferiores que estão presentes em um determinado ambiente. Esses microrganismos podem ser identificados através da análise dos genes 16S rRNA e 18S rRNA proveniente de uma amostra biológica (Marchesi *and* Ravel, 2015). O avanço de novas técnicas de identificação de bactérias independentes do meio de cultura permitiu a quantificação da microflora bacteriana de peixes. Assim é possível estimar que a população bacteriana do trato intestinal dos peixes é de aproximadamente  $10^8.g^{-1}$  e  $10^5.g^{-1}$ , de heterótrofos aeróbicos e anaeróbicas, respectivamente (Austin, 2006).

Os estudos feitos na última década em microbiota intestinal dos peixes têm auxiliado na compreensão do papel que as comunidades microbianas desempenham no hospedeiro. Na revisão de Wang et al. (2018), este autor explica a influência da microbiota intestinal em muitas funções biológicas importantes para os peixes, como nutrição e imunologia. As

comunidades bacterianas intestinais ajudam o sistema imunológico, e são de vital importância para a resistência às doenças nos peixes (Gómez *and* Balcázar, 2008). Algumas bactérias da microbiota intestinal, como os Lactococcus, são benéficas para os peixes, pois ajudam a reduzir a adesão de muitos patógenos nos intestinos (Gómez *and* Balcázar, 2008). Por outro lado, os filos dominantes, como Firmicutes e Proteobacterias, desempenham funções importantes nos processos absorção e metabolismos de carboidratos (Yang *et al.*, 2019) e lipídios (Semova *et al.*, 2012) nos peixes. Isso confirma o importante papel da microbiota intestinal no balanço energético do hospedeiro. Apesar de muitos estudos feitos sobre as comunidades bacterianas intestinais nos peixes nossa compreensão da microbiota ainda é limitada.

É muito importante conhecer e entender como as interações entre a microbiota e o hospedeiro ajudam a manter um estado saudável nos peixes (Pérez *et al.*, 2010). A microbiota intestinal dos peixes não é constante, essas comunidades bacterianas podem ser afetadas por diferentes fatores endógenos e exógenos (Dehler *et al.*, 2017). Pesquisas feitas nos últimos anos determinaram que fatores como: habitat (Gaikwad *et al.*, 2017), sexo, tamanho, dieta (Bolnick *et al.*, 2014a, 2014b) e idade (Stephens *et al.*, 2016) podem influenciar as mudanças na composição e estrutura da microbiota intestinal nos peixes. Nayak (2010) sugere que a microbiota do ambiente circundante ao peixe pode influenciar na colonização da microflora residente no seu intestino. Conhecer a composição da microbiota intestinal dos peixes nos proporciona informação sobre a função e a estabilidade dos microrganismos, e principalmente sobre a saúde dos peixes, e a qualidade do ambiente que os cerca.

A poluição antrópica é outro fator ambiental que influencia negativamente na microbiota intestinal de peixes selvagem (Giang *et al.*, 2018). Os poluentes são estressores ambientais que podem enfraquecer o sistema imune dos peixes e permitir que patógenos colonizem o trato intestinal (Hansen *and* Olafsen, 1999). Apesar de haver muitos estudos sobre os efeitos negativos da poluição antrópica nos peixes (Garcia-Reyero *et al.*; McCallum *et al.*, 2016; Melvin, 2016; Vajda *et al.*, 2011), há poucos estudos que utilizam a avaliação da sua composição microbiana como um marcador para avaliação da qualidade ambiental (Giang *et al.*, 2018).

### 3.5 Biomarcadores microbianos

Segundo WHO (1993) –os biomarcadores são todas ou quase todas as medidas que refletem uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, que pode ser químico, físico ou biológico”. Essas respostas biológicas podem ser medidas dentro de um organismo ou em seus produtos, como urina, fezes, pêlos, penas, etc. (Van Gestel *and* Van Brummelen, 1996) indicando alguma falha do estado normal que não pode ser detectada nos organismos saudáveis. Em teoria os biomarcadores podem antecipar efeitos biológicos significativos nos organismos e por isso são utilizados como ferramentas para avaliação e monitoramento ambiental (Lam, 2009).

Segundo (NRC, 1987) e WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes: biomarcador de exposição, efeito e susceptibilidade. Biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou populações a uma determinada substância. Biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde devido à exposição externa e absorção de um produto químico. Biomarcadores de suscetibilidade ajudam a elucidar as variações no grau de respostas à exposição a substâncias tóxicas observadas entre diferentes indivíduos.

Nos últimos anos a microbiota intestinal somente foi usada como biomarcador para correlacionar bactérias intestinais com algumas doenças presentes nos vertebrados maiores (Duranti *et al.*, 2016; Mancabelli *et al.*, 2017). Em peixes, os biomarcadores foram usados em estudos ecotoxicológicos para avaliar os impactos dos poluentes baseando-se principalmente em análises histopatológicas, bioquímicas e genéticas (De la Torre *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2015; Ossana *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2018; Van der Oost *et al.*, 2003). Até o momento, pouca atenção tem sido dada aos efeitos dos contaminantes ambientais na composição das comunidades microbianas intestinais dos organismos aquáticos. Partindo do pressuposto que um biomarcador é uma resposta biológica medida nos produtos de um organismo, como por exemplo as fezes, pode-se sugerir o termo biomarcadores microbiológicos em peixe, para nos referirmos às variações biológicas que estão ligadas a alterações na microbiota intestinal dos organismos causadas pela exposição dos contaminantes ambientais.

É muito importante conhecer marcadores microbianos que nos ajudem a monitorar a contaminação antrópica. Atualmente existem grupos bacterianos que são usados há décadas como indicadores de qualidade ambiental, como por exemplo, as bactérias coliformes, mas

esses grupos microbianos somente podem ser medidos na água para determinar contaminação por esgoto (Rompré *et al.*, 2002; Tallon *et al.*, 2005). Até agora, a informação sobre novos grupos microbianos intestinais usados para medir o efeito da contaminação antrópica presente nos organismos é limitada. Em relação aos peixes essa informação se restringe ainda mais. Assim, existe a necessidade de encontrar novos grupos bacterianos que ajudem a medir a qualidade ambiental, já que muitos corpos da água são contaminados por uma mistura de poluentes provenientes dos esgotos urbanos e efluentes industriais.

### **3.6 Metabarcoding bacteriano**

Segundo Taberlet *et al.* (2012), o *metabarcoding* é a identificação de múltiplas espécies presente em uma amostra ambiental através da extração do DNA total dos organismos ali presentes. Nesta técnica, usam-se amostras ambientais (solo, água, fezes, etc.) modernas e antigas para amplificação de genes conservados usando plataformas de sequenciamento de próxima geração. O desenvolvimento de plataformas de *next generation sequencing* (NGS) tornou possível a avaliação de uma ampla gama de fenômenos biológicos relacionado ao genoma (Shendure *and* Ji, 2008). Essa revolução na tecnologia de sequenciamento junto às ferramentas avançadas de bioinformática deram força aos estudos metagenômicos baseados no gene 16S rRNA (Tringe *and* Hugenholtz, 2008). Enfoques baseados na amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA tornou-se o principal enfoque para estudos de diversidade microbiana. Este enfoque permite uma rápida identificação e análise de grupos bacterianos em vários níveis taxonômicos do que os métodos taxonômicos tradicionais.

O 16S é um bom marcador filogenético utilizado para avaliações de comunidades microbianas (Mao *et al.*, 2012) e para estudos de diversidade bacteriana (Fantini *et al.*, 2015). A aplicação de NGS tem levado a um tremendo crescimento nos dados de sequência disponíveis, tornando-se uma ferramenta importante para melhor compreensão da natureza e o meio ambiente.

Com o uso de NGS, muitas pesquisas demonstraram que a microbiota intestinal varia em diferentes espécies, devido a diferentes fatores ambientais, como dieta e habitat. Esses estudos também mostraram que a microbiota intestinal da maioria dos peixes está dominada pelos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (Carda-Diéguez *et al.*, 2014; Ingerslev *et al.*, 2014). Assim mesmo, os gêneros bacterianos dominantes para os peixes de água doce foram *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Bacteroides* tipo A, com *Plesiomonas*,

*Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Acinetobacte*, *Clostridium*, *Bacteroides* tipo B e *Fusarium* (Austin, 2006; Gómez and Balcázar, 2008). O uso das diferentes plataformas de NGS, como, por exemplo, Illumina MiSeq e PGM, permitiram ampliar nossa compreensão das comunidades microbianas presente nos intestinos dos peixes (Ghanbari *et al.*, 2015). Embora a maioria das pesquisas sobre a microbiota intestinal tenha sido feito nos peixes comerciais (Carda-Diéguez *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), um pequeno número de pesquisas recentes forneceu como os peixes selvagens também podem estar sendo afetados pela contaminação antrópica (Giang *et al.*, 2018).

Existe a necessidade de encontrar maneiras de avaliar os efeitos da contaminação ambiental nos ecossistemas aquáticos. Os contaminantes ambientais causam múltiplas alterações químicas, histopatológicas, bioquímicas e genéticas nos peixes, mas o conhecimento sobre esses contaminantes nas comunidades microbianas ainda não é bem estudada. Assim, a finalidade do presente estudo é identificar, comparar e determinar os efeitos da contaminação ambiental ao nível microbiano em peixe. Para atingir esse objetivo foram analisadas a microbiota intestinal de peixes poecilídeos provenientes de dois riachos com diferentes impactos antrópicos. Espera-se que os contaminantes ambientais influenciem nas comunidades bacterianas intestinais das populações dos peixes. Usando um enfoque metagenômico foram caracterizadas as comunidades bacterianas dos poecilídeos. Essa investigação irá ajudar no progresso do conhecimento de ecotoxicologia em estuário, servindo de referência ou marco de comparação para futuros estudos em contaminação de ambientes aquáticos causado pelos resíduos urbanos e efluentes industriais.

## **4. OBJETIVO**

### **Objetivos gerais**

Detectar a influência da mistura dos contaminantes ambientais na microbiota intestinal das populações de guarú *Phalloceros caudimaculatus* em dois riachos com diferentes perfis de contaminação.

### **Objetivos específicos**

- Descrever a estrutura e composição da microbiota do intestino dos guarú em dois riachos com diferentes impactos antrópicos.
- Avaliar os efeitos da contaminação ambiental na diversidade microbiana intestinal de peixe guarú.
- Identificar biomarcadores microbianos de contaminação aquática com base na comparação da microbiota intestinal de peixes proveniente de dois riachos com diferentes níveis de impactos antrópicos.



## 5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L., Andersen, O.K., 2001. Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Mar. Environ. Res.* 52, 213–229.
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712.
- Araújo, F., Peixoto, M., Pinto, B., Teixeira, T., 2009. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Braz. J. Biol.* 69, 41–48.
- Asagbra, M., Adebayo, A., Anumudu, C., Ugwumba, O., Ugwumba, A., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and fish from the Warri River at Ubeji, Niger Delta, Nigeria. *African J. Aquat. Sci.* 40, 193–199.
- Austin, B., 2006. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *Sci. World J.* 6, 931–945.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114.
- Bao, S., Nie, X., Liu, Y., Wang, C., Li, W., Liu, S., 2018. Diclofenac exposure alter the expression of PXR and its downstream target genes in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Sci. Total Environ.* 616–617, 583–593.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for?. *Environ. Pollut.* 112, 285–298.
- Benedicto, J., Andral, B., Martínez-Gómez, C., Guitart, C., Deudero, S., Cento, A., Scarpato, A., Caixach, J., Benbrahim, S., Chouba, L., Boulahdid, M., Galgani, F., 2011. A large scale survey of trace metal levels in coastal waters of the Western Mediterranean basin using caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Environ. Monit.* 13, 1495.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res.* 47, 650–660.
- Betito, R., 2006. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (cyprinodontiformes) no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). *Rev. Didat. Sist. Rio Gd.* 3, 71–100.
- Beyer, J., Jonsson, G., Porte, C., Krahn, M.M., Ariese, F., 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 224–244.
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Knight, R., Caporaso, J.G.,

- Svanbäck, R., 2014a. Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch). *Ecol. Lett.* 17, 979–987.
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Org, E., Parks, B., Lusi, A.J., Knight, R., Caporaso, J.G., Svanbäck, R., 2014b. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 5, 4500.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Carda-Diéguez, M., Mira, A., Fouz, B., 2014. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 451–459.
- Chivittz, C.C., Pinto, D.P., Ferreira, R.S., Sopezki, M. da S., Fillmann, G., Zanette, J., 2016. Responses of the CYP1A biomarker in *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* and evaluation of a CYP1A refractory phenotype. *Chemosphere* 144, 925–931.
- Clark, B.W., Di Giulio, R.T., 2012. *Fundulus heteroclitus* adapted to PAHs are cross-resistant to multiple insecticides. *Ecotoxicology* 21, 465–474.
- CONAMA, 17 de março 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução no 357 . Acess: 24 janeiro 2019. [www.mma.gov.br/port/conama](http://www.mma.gov.br/port/conama)
- Cossins, A.R., Crawford, D.L., 2005. Fish as models for environmental genomics. *Nat. Rev. Genet.* 6, 324–333.
- Da Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, V., 2003. Biomonitoramento Ambiental., in: Da Silva, J., Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. (Eds.), *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, p. 167–174.
- De la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L., 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582–1590.
- Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2017. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 467, 149–157.
- Duranti, S., Gaiani, F., Mancabelli, L., Milani, C., Grandi, A., Bolchi, A., Santoni, A., Lugli, G.A., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Bertoni, S., Vivo, V., Serafini, F., Barbaro, M.R., Fugazza, A., Barbara, G., Gioiosa, L., Palanza, P., Cantoni, A.M., De'Angelis, G.L., Barocelli, E., De'Angelis, N., van Sinderen, D., Ventura, M., Turroni, F., 2016. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: Bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, f1w191.
- Dutton, C.L., Subalusky, A.L., Hamilton, S.K., Rosi, E.J., Post, D.M., 2018. Organic matter loading by hippopotami causes subsidy overload resulting in downstream hypoxia and fish kills. *Nat. Commun.* 9, 1951.
- Engraff, M., Solere, C., Smith, K.E.C., Mayer, P., Dahllöf, I., 2011. Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity. *Aquat. Toxicol.* 102, 142–149.

- Esteves, F., 2011. Fundamentos de limnologia, 3a. Edição. ed. Rio de Janeiro Brasil : Interciência. 826 p.
- Fantini, E., Gianese, G., Giuliano, G., Fiore, A., 2015. Bacterial metabarcoding by 16S rRNA gene Ion Torrent amplicon sequencing. Humana Press, New York, NY, pp. 77–90.
- Fenet, H., Gomez, E., Rosain, D., Casellas, C., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase activity in Caged European Eels. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 232–236.
- Ferreira, R.B. , Condini, M.V., Garcia, A.M., 2013. Fish species list of coastal streams in southern Brazil, with notes on austral distribution limits of marine and freshwater endangered species, Pan-American Journal of Aquatic Sciences.
- Ferreira, R.S., Chivittz, C. da C., Dos Santos, G.S. , Zanette, J., 2016. Cytochrome P450 1A mRNA in the guppy *Phalloceros caudimaculatus* and response to beta-naphthoflavone and environmental samples. Aquat. Toxicol. 181, 86–93.
- Firmiano, K.R., Ligeiro, R., Macedo, D.R., Juen, L., Hughes, R.M., Callisto, M., 2017. Mayfly bioindicator thresholds for several anthropogenic disturbances in neotropical savanna streams. Ecol. Indic. 74, 276–284.
- Froese, R., Pauly, D., 2019. FishBase. Publicação eletrônica da World Wide Web. www.fishbase.org, versão (02/2019).
- Gaikwad, S.S., Shouche, Y.S., Gade, W.N., 2017. Deep sequencing reveals highly variable gut microbial composition of invasive fish Mossambicus Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) collected from two different habitats. Indian J. Microbiol. 57, 235–240.
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C.M., Escalon, B.L., Martinović, D., Kroll, K.J., Sorensen, P.W., Denslow, N.D., Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. Aquat. Toxicol. 101, 38–48.
- Garcia, M.R., Mirlean, N., Baisch, P.R., Caramão, E.B., 2010. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon influx and sediment contamination in an urbanized estuary. Environ. Monit. Assess. 168, 269–276.
- Gauthier, P.T., Norwood, W.P., Prepas, E.E., Pyle, G.G., 2014. Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. Aquat. Toxicol. 154, 253–269.
- Getzner, M., 2002. Investigating public decisions about protecting wetlands. J. Environ. Manage. 64, 237–246.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K.J., 2015. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. Aquaculture 448, 464–475.
- Giang, P.T., Sakalli, S., Fedorova, G., Tilami, S.K., Bakal, T., Najmanova, L., Grabicova, K., Kolarova, J., Sampels, S., Zamaratskaia, G., Grabic, R., Randak, T., Zlabek, V., Burkina, V., 2018. Biomarker response, health indicators, and intestinal microbiome composition in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario L.*) exposed to a sewage treatment plant effluent-dominated stream. Sci. Total Environ. 625, 1494–1509.
- Gómez, G.D., Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish: Table 1. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52, 145–154.

- Guimarães, E.T., Macchione, M., Lobo, D.J.A., Domingos, M., Saldiva, P.H.N., 2004. Evaluation of the mutagenic potential of urban air pollution in São Paulo, Southeastern Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *Environ. Toxicol.* 19, 578–584.
- Han, D., Currell, M.J., Cao, G., 2016. Deep challenges for China's war on water pollution. *Environ. Pollut.* 218, 1222–1233.
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26.
- Harikishore, D. K. R., 2017. Water pollution control technologies. *Environ. Sustain. Technol.* 3–22.
- Holt, M., 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.* 38, S21–S27.
- Hu, Y., Cheng, H., 2013. Water pollution during China's industrial transition. *Environ. Dev.* 8, 57–73.
- Ingerslev, H.-C., Strube, M.L., Jørgensen, L. von G., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L., 2014. Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 40, 624–633.
- Isbell, F., Reich, P.B., Tilman, D., Hobbie, S.E., Polasky, S., Binder, S., 2013. Nutrient enrichment, biodiversity loss, and consequent declines in ecosystem productivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Kennish, M.J., 2002. Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ. Conserv.* 29, 78–107.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8897–901.
- Kjerfve, B., 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons, *Estuarine Variability*. Academic Press, Orlando, FL, U.S.A.
- Lam, P.K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manag.* 52, 348–354.
- Larsen, A.M.M., Mohammed, H.H.H., Arias, C.R.R., 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1396–1404.
- Lee, J.W., Won, E.-J., Raisuddin, S., Lee, J.-S., 2015. Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. *J. Environ. Sci.* 35, 115–127.
- Li, T., Long, M., Gatesoupe, F.-J., Zhang, Q., Li, A., Gong, X., 2015. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microb. Ecol.* 69, 25–36.
- Li, Y., Wang, H., Xia, X., Zhai, Y., Lin, H., Wen, W., Wang, Z., 2018. Dissolved organic matter affects both bioconcentration kinetics and steady-state concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 639, 648–656.

- Livingstone, D., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 120, 43–49.
- Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. *Neotrop. Ichthyol.* 6, 113–158.
- Lynch, M.J., Stretesky, P.B., Long, M.A., 2017. State and green crimes related to water pollution and ecological disorganization: water pollution from publicly owned treatment works (POTW) facilities across US states. *Palgrave Commun.* 3, 17070.
- Maltchik, L., 2003. Three new wetlands inventories in Brazil. *Interciencia* 28, 421–423.
- Maltchik, L., Lanés, L.E.K., Keppeler, F.W., Rolon, A.S., Stenert, C., 2014. Landscape and habitat characteristics associated with fish occurrence and richness in southern Brazil palustrine wetland systems. *Environ. Biol. Fishes* 97, 297–308.
- Maltchik, L., Rolon, A.S., Guadagnin, D.L., Stenert, C., 2004. Wetlands of Rio Grande do Sul, Brazil: A classification with emphasis on plant communities. *Acta Limnol. Bras* 16, 137–151.
- Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G.A., Turrone, F., Cocconi, D., Van Sinderen, D., Ventura, M., 2017. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93.
- Mao, D.-P., Zhou, Q., Chen, C.-Y., Quan, Z.-X., 2012. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol.* 12, 66.
- Marchesi, J.R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome* 3, 31.
- McAuliffe, C.D., 1987. Organism exposure to volatile/soluble hydrocarbons from crude oil spills—a field and laboratory comparison. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* 1987, 275–288.
- McCallum, E.S., Du, S.N., Vaseghi-Shanjani, M., Choi, J.A., Warriner, T.R., Sultana, T., Scott, G.R., Balshine, S., 2016. In situ exposure to wastewater effluent reduces survival but has little effect on the behaviour or physiology of an invasive Great Lakes fish. *Aquat. Toxicol.* 184, 37–48.
- Meador, M.R., Frey, J.W., 2018. Relative importance of water-quality stressors in predicting fish community responses in midwestern streams. *JAWRA J. Am. Water Resour. Assoc.* 54, 708–723.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelao, R.M., Del Rosso, C., Fillmann, G., Zamboni, A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77–87.
- Melvin, S.D., 2016. Short-term exposure to municipal wastewater influences energy, growth, and swimming performance in juvenile Empire Gudgeons (*Hypseleotris compressa*). *Aquat. Toxicol.* 170, 271–278.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278–1284.
- Mumtaz, M.M., George, J.D., Gold, K.W., Cibulas, W., Derosa, C.T., 1996. ATSDR

- evaluation of health effects of chemicals. Iv. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol. Ind. Health* 12, 742–971.
- Muthusamy, S., Peng, C., Ng, J.C., 2016. Effects of binary mixtures of benzo[a]pyrene, arsenic, cadmium, and lead on oxidative stress and toxicity in HepG2 cells. *Chemosphere* 165, 41–51.
- Myers, M.S., Johnson, L.L., Collier, T.K., 2003. Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in english sole (*Pleuronectes vetulus*). *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 9, 67–94.
- Ndiaye, A., Sanchez, W., Durand, J.D., Budzinski, H., Palluel, O., Diouf, K., Ndiaye, P., Panfili, J., 2012. Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 4133–4147.
- Nganje, T.N., Edet, A.E., Ibok, U.J., Ukpabio, E.J., Ibe, K.A., Neji, P., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water and soil in the vicinity of fuel-oil spillage from a tank farm distribution facility, Esuk Utan, Calabar Municipality, Nigeria. *Environ. Earth Sci.* 67, 81–90.
- NRC, 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ. Health Perspect.* 74, 3–9.
- O'Connor, N.E., Bracken, M.E.S., Crowe, T.P., Donohue, I., 2015. Nutrient enrichment alters the consequences of species loss. *J. Ecol.* 103, 862–870.
- Odebrecht, C.; Abreu, P.C.; Bemvenuti, C.E.; Copertino, M.; José H. Muelbert, J.H.; Vieira, J.P.; Seeliger, U. (2010) - The Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil - Biotic Responses to Natural and Anthropogenic Impacts in the Last Decades (1979–2008). *In: Michael J. Kennish, Hans W. Paerl (org.), Coastal Lagoons: Critical Habits of Environmental Change*, pp. 434455, CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.. ISBN: 9781420088311.
- Ossana, N.A., Eissa, B.L., Baudou, F.G., Castañé, P.M., Soloneski, S., Ferrari, L., 2016. Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 73–81.
- Pereira Netto, A.D., Moreira, J.C., Elisa O Dias, A.X., Arbilla, G., Filipe Ferreira, L. V, Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAS): A review of methodology. *Quim. Nova* 23.
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Múzquiz, J.L., 2010. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol.* 3, 355–360.
- Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P. V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1182–1189.

- Rolon, A.S., Maltchik, L., 2006. Environmental factors as predictors of aquatic macrophyte richness and composition in wetlands of southern Brazil. *Hydrobiologia* 556, 221–231.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., Laurent, P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31–54.
- Santana, M.S., Sandrini-Neto, L., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., Di Domenico, M., Prodocimo, M.M., 2018. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* 242, 449–461.
- Schmitt, C.J., Zajicek, J.L., May, T.W., Cowman, D.F., 1999. Organochlorine residues and elemental contaminants in U.S. freshwater fish, 1976-1986: National contaminant biomonitoring program. Springer, New York, NY, pp. 43–104.
- Schmitter-Soto, J.J., Ruiz-Cauich, L.E., Herrera, R.L., González-Solís, D., 2011. An index of biotic integrity for shallow streams of the Hondo River basin, Yucatan Peninsula 409, 844–852.
- Schweitzer, L., Noblet, J., 2018. Water contamination and pollution, in: *Green chemistry*. Elsevier, pp. 261–290.
- Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., Mackey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the Zebrafish. *Cell Host Microbe* 12, 277–288.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1135–1145.
- Siroká, Z., Drastichová, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination-Cytochrome P450 in Fish. *Acta Vet. Brno* 73, 123–132.
- Stephens, W.Z., Burns, A.R., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J.F., Guillemin, K., Bohannon, B.J.M.M., 2016. The composition of the Zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME J.* 10, 644–654.
- Sudaryanto, A., Takahashi, S., Monirith, I., Ismail, A., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B.J., Subramanian, A., Prudente, M., Hue, N.D., Tanabe, S., 2002. Asia-Pacific mussel watch: Monitoring of butyltin contamination in coastal waters of Asian developing countries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2119–2130.
- Suyama, F., Guimarães, E.T., Lobo, D.-J.A., Rodrigues, G.S., Domingos, M., Alves, E.S., Carvalho, H.A., Saldiva, P.H.N., 2002. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 127–129.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 2045–2050.
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T., 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. *Water. Air. Soil Pollut.* 166, 139–166.
- Tang, L., Tang, X.-Y., Zhu, Y.-G., Zheng, M.-H., Miao, Q.-L., 2005. Contamination of

- polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. *Environ. Int.* 31, 822–828.
- Tringe, S.G., Hugenholtz, P., 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 442–446.
- Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Bolden, A.M., Schoenfuss, H.L., Norris, D.O., 2011. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquat. Toxicol.* 103, 213–221.
- Valdés, M.E., Amé, M.V., Bistoni, M. de los A., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472, 389–396.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217–225.
- Vane, C.H., Kim, A.W., Beriro, D.J., Cave, M.R., Knights, K., Moss-Hayes, V., Nathanail, P.C., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK. *Appl. Geochemistry* 51, 303–314.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Baršienė, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 479–487.
- Waite, I.R., Van Metre, P.C., 2017. Multistressor predictive models of invertebrate condition in the Corn Belt, USA. *Freshw. Sci.* 36, 901–914.
- Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquac.* 10, 626–640.
- Watanabe, T., Coler, R.A., Paz, R.J., 1999. The implementation of a regional biomonitoring program in northeast Brazil. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2, 187–189.
- WHO, 1993. International programme on chemical safety. 1993.
- Yang, G., Jian, S.Q., Cao, H., Wen, C., Hu, B., Peng, M., Peng, L., Yuan, J., Liang, L., 2019. Changes in microbiota along the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Community, interspecific interactions, and functions. *Aquaculture* 498, 151–161.
- Zanette, J., 2013. Genes and proteins related with biotransformation in tropical fishes, in: De Almeida, E.A., Ribeiro, C.A. de O. (Eds.), *Pollution and Fish Health Tropical Ecosystems*. pp. 15–34.



## 6. MANUSCRITO

### **Environmental contamination alters the intestinal microbial community of the livebearer killifish *Phalloceros caudimaculatus***

Manuscrito redigido conforme a normas da revista *Science of the Total Environment*.

**Environmental contamination alters the intestinal microbial community of the  
livebearer killifish *Phalloceros caudimaculatus***

Christian Deyvis Nolorbe Payahua<sup>a</sup>, Anderson Freitas<sup>b</sup>, Luiz Fernando Wurdig Roesch<sup>b</sup> and  
Juliano Zanette<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Campus Carreiros, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil

<sup>b</sup>Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia – CIP-Biotec, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS 97300-162, Brazil

**Number of Figures: 6**

\* Correspondence to:

Juliano Zanette

Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Av. Itália, Km 8, Campus Carreiros, 96203-900

Phone: +55 53 984682673

Rio Grande, RS, Brasil

julianozanette@furg.br, [biozanette@hotmail.com](mailto:biozanette@hotmail.com)

## 2 **Abstract**

3 Intestinal microbiota performs important functions for the health of fishes. Knowing its  
4 composition and evaluating the possible effects caused by anthropogenic pollution in the  
5 intestinal microbiota of fish populations might represent an important step in defining  
6 microbial biomarkers for water pollution. This study evaluated the impact of environmental  
7 contamination on the gut microbiota of the livebearer killifish *Phalloceros caudimaculatus*.  
8 Metagenomic was evaluated using the V4 region of the 16S rRNA gene to characterize and  
9 compare the microbiota of two *P. caudimaculatus* populations from streams with different  
10 anthropogenic impact. The dominant groups at the Phylum level were Proteobacteria and  
11 Firmicutes with more than 80% of relative abundance. *Burkholderia* was the more abundant  
12 in the Genus level with more than 35% of relative abundance. Thirteen bacterial OTUs were  
13 shared between both fish populations and might represent the core microbiota of the gut in  
14 this specie. We detected a lower microbial diversity (Shannon index and observed OTUs) in  
15 fish from the polluted stream, compared to the reference. The PERMANOVA analysis  
16 showed that the intestinal microbial communities from fish from the polluted stream were  
17 distinct from those found in the reference stream ( $P < 0.05$ ). We identified the *Methylocaldum*  
18 and *Rhodobacter* genus correlated strongly with the polluted stream. These two taxa might  
19 represent potential microbial biomarkers of exposure to environmental contaminants in the  
20 gut of fish. To our knowledge, this is the first study to compare intestinal bacteria in wild fish  
21 using a metagenomic approach in order to estimate the impacts of anthropogenic pollution.

22 **Keywords:** gut microbiota, microbial diversity, next generation sequencing, *Phalloceros*  
23 *caudimaculatus*, pollution, 16S rRNA.

24

## 25 **1. Introduction**

26           Currently, there is a great and global concern about the pollution of aquatic  
27 ecosystems. Development of anthropic activities led many countries to a critical level of  
28 pollution due to the huge amount and diversity of residues that it creates and that end in the  
29 water bodies (Hu and Cheng, 2013). Many aquatic ecosystems near to urban areas, such as  
30 streams or lagoons, are often the final receptors of urban waste and industrial effluents  
31 (Garcia et al., 2010). The contaminants present in anthropogenic waste, e.g. polycyclic  
32 aromatic hydrocarbons (PAHs), are considered possible threats to organisms due to their toxic  
33 effect (Baird et al., 2005). Anthropogenic waste contains a mixture of contaminants that can  
34 cause physiological and functional alterations (Ndiaye et al., 2012), or even reduced survival  
35 in fishes (McCallum et al., 2016). A recent study showed how anthropogenic waste causes  
36 negative effects on the intestinal bacterial composition of fish exposed under fully natural  
37 conditions (Giang et al., 2018). Last years, studies in intestinal microbiota using metagenomic  
38 approach showed that fish cannot truly be considered independently of its bacterial  
39 communities (Ghanbari, 2015).

40           Gut microbial community performs multiple functions that help to maintain a healthy  
41 state in fishes (Pérez et al., 2010). These microbial communities are involved in important  
42 biology function as nutrition (Clements, 1997), physiology and immunology (Nayak, 2010).  
43 Nonetheless, there are environmental and ecological factors that could shape the gut  
44 microbiota in fish (Dehler et al., 2017). The factors shaping this microbiota in gut of fish  
45 could include the exposure to multiple environmental contaminants such microplastic (Jin et  
46 al., 2018), organic biocide (Kan et al., 2015) and metal (Zhai et al., 2017). Ecotoxicology  
47 studies were carried out to evaluate the effects of isolated environmental contaminants in the  
48 gut microbiota under laboratory conditions (Evariste et al. 2019). In contrast, little is known  
49 about how contaminants mixtures influence the gut microbiota of fish in the wild.

50           The understanding of the composition of the gut microbiota of fish could enable the  
51 assessment of the host's health and the quality of the surrounding environment as well (Giang  
52 et al., 2018). From an ecotoxicological point of view, little attention has been given to analyze  
53 the gut microbiota of fish as a parameter for the evaluation of the environmental quality.  
54 Characterize the gut microbiota of *P. caudimaculatus* from two streams with different  
55 anthropogenic impact. The aims of this study were to find the microbial groups that are shared  
56 and compose the core microbiota, identify alterations in the microbial structure related to

57 environmental contamination and suggest potential biomarkers of environmental  
58 contamination.

## 59 **2. Materials and methods**

### 60 **2.1. Sampling, selection and site characterization.**

61 Male *P. caudimaculatus* fish (lengths  $2.4 \pm 0.1$  cm) were collected in October of 2017  
62 from two streams with different anthropogenic impacts in the city of Rio Grande, RS, Brazil  
63 (n=20 fish in each site). The sampling site in the polluted stream (32°02'56.48 "S,  
64 52°05'06.98" W) is located in the margin of a petroleum refinery, between an urban area with  
65 high population density and an industrial area. This area receives urban sewage and industrial  
66 effluents and has been historically contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons  
67 (PAHs) (Medeiros et al., 2005). The sampling site in the reference stream (32° 33' 32.48 "S,  
68 52° 23' 54.59" W) is a watercourse located 14 km away from the closest urban area at Cassino  
69 Beach's and any industrial activity, so it is relatively less impacted by anthropogenic  
70 contamination (Fig. 1). Chivittz et al. (2016) analyzed 16 EPA priority PAHs in sediment in  
71 those sites, confirming very different levels of PAHs in the polluted and reference stream  
72 (4414.0 and 1.7 ng. g<sup>-1</sup> dry weight, respectively).

73 All fish collected were transported to the Laboratory of the Institute of Biological  
74 Sciences in the Federal University of Rio Grande (ICB-FURG). The use of fish and  
75 euthanasia procedures were approved by the Committee on Ethics and Use of Animals  
76 (CEUA-P003/2018, FURG) and by the System of Authorization and Information on  
77 Biodiversity (SISBIO/60693-1). Fish were euthanized with an overdose of Tricaine  
78 methanesulfonate (MS222) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and exterior surfaces  
79 swabbed with the same water of MS222 solution before dissection of the whole intestine  
80 using sterile instruments. All intestines were extracted and stored individually at - 20 ° C.

### 81 **2.2. Microbial DNA extraction, 16S rRNA gene amplification and sequencing**

82 Entire fish intestines were mashed and the microbial DNA was isolated from them by  
83 using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the  
84 manufacturer's instructions. DNA quality was defined by spectrophotometry using  
85 NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Due to a low initial  
86 DNA concentration, all samples were centrifuged for 1 h at 60 °C in a vacuum centrifuge to  
87 obtain higher concentrations of microbial DNA. All the DNA samples were stored at -20 °C

88 until its use in PCR reactions. The determination of the intestinal microbial community was  
89 based on partial 16S rRNA gene (V4 region) sequences, directly amplified using  
90 bacterial/archaeal primer 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-  
91 GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012). PCR reactions were performed  
92 with the Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).  
93 Each of the 25 µL PCR mixture contained 2.5 µl MgCl<sub>2</sub> buffer, 0.1 µL Recombinat® Taq  
94 DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,5 µL de Dntp Mix, 0,5  
95 µL de Ultrapure BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µl of primer 806R barcoded (PB),  
96 0,25 µL of the primer 515F (PF), 1 µL MgCl<sub>2</sub>, 14,15 µL of water Mili-Q and approximately 5  
97 µL of DNA model. The PCR conditions were 95 °C during 5 min, 30 cycles of 94 °C for 45 s  
98 of desnaturation; 56 °C for 45 s of annealing and 72 °C for 1 min of extension; followed by  
99 72 for 10 min. The PCR products were purified with Agencourt® AMPure® O reagent XP  
100 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), quantified using the Qubit fluorometer kit (Invitrogen,  
101 Carlsbad, CA, USA) and combined in equimolar concentrations (0.2 ng.µL<sup>-1</sup>) to create a  
102 mixture composed by amplified fragments of the 16S of gene of each sample. The samples  
103 with concentrations lower than 0.2 ng.µL<sup>-1</sup> were not considered for sequencing. From the 40  
104 quantified samples, only 31 samples presented values higher than 0.2 ng.µL<sup>-1</sup> of DNA (15  
105 from the polluted and 16 from the reference streams). The Ion OneTouch™ 2 system with the  
106 Ion PGM™ kit model OT2 400 model (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was  
107 used for the library preparation and the sequencing was performed using the Ion PGM™  
108 Sequencing 400 system in the Ion PGM™ system using Ion 318™ Chip v2.

### 109 **2.3. 16S Sequence processing for downstream analyses**

110 The 16S rRNA reads from the Ion PGM™ system were analyzed using the BMP  
111 Operational System (BMPOS) (Pylro et al., 2016) following the recommendations of the  
112 Brazilian Microbiome Project (Pylro et al., 2014) for removal the errors and chimeric  
113 sequences. For the taxonomic analyses, the sequences obtained were clustered into  
114 Operational Taxonomic Units (OTUs) and was built a table with all the OTUs using the  
115 UPARSE pipeline (Edgar, 2013). We used the unique barcodes present in each sample to bin  
116 the sequences by its origin, which it was removed for downstream analyses.

117 Sequence length and quality were evaluated for each read. Raw reads were trimmed at  
118 200 bp and quality filtered using a maximum expected error of 0.5. Filtered reads were de-  
119 replicated and singletons were removed. The sequences were clustered into OTUs at 97%

120 similarity cut-off following the UPARSE pipeline, chimeras were identified and removed that  
121 ones which were not recognized as novel sequence during the alignment process. Thus, we  
122 obtained representative sequences for each microbial phylotype (Edgar, 2013). Finally, the  
123 sequences were clustered, aligned and taxonomically classified in the software QIIME  
124 (Caporaso et al., 2010) based on the UCLUST method against the Greengenes 13.5 database  
125 (McDonald et al., 2012) with a confidence of 97%. Sampling effort was estimated using  
126 Good's coverage (Good, 1953). The profile of OTUs was used to visualize the relative  
127 abundances of phylum in fish from the two streams (reference and polluted) and the relative  
128 abundances of phylum and genus in individual samples of the two streams. The core  
129 microbiota in the gut of *P. caudimaculatus* was addressed by identifying the taxa that  
130 presented prevalence equal or higher than 90 % in the total of gut samples that were  
131 sequenced (reference plus polluted). The taxa with detection threshold (relative abundance,  
132 %) lower than 0.001 were not considered for the core microbiota count.

#### 133 **2.4. Statistical analysis of data.**

134 All statistical analyses were carried out using R (R Development Core Team, 2008).  
135 The normality of data was tested by Shapiro–Wilk W test. Data set from 16S rRNA was  
136 rarefied to the same number of sequence found in the smallest following the  
137 recommendations of Lemos et al. (2011). Alpha diversity of samples was calculated and  
138 plotted using the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) and was measured by  
139 observed species and the Shannon diversity. The observed species index measures the number  
140 of different species or richness per each sample and Shannon index measures diversity using  
141 the OTUs richness and the relative abundance of the different species or evenness. Significant  
142 differences in the diversity of the gut microbiota, comparing fish from polluted and reference  
143 streams, were evaluated using Mann-Whitney non-parametric tests ( $P < 0.05$ ).

144 Beta-diversity was analyzed to compare the microbial community between different  
145 samples through a Principal Coordinates Analysis (PCoA) using the phyloseq package  
146 (McMurdie and Holmes, 2013). This method was based on multivariate statistical analysis  
147 where we used dissimilarity matrix, with Bray-Curtis and binary distance metrics. We  
148 analyzed the significant differences between observed group by PCoA using a non-parametric  
149 Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) with the Adonis function  
150 available in the vegan package (Oksanen et al., 2015) with 999 permutations for detecting  
151 confounding variables.

152 Identification and classification of bacterial OTUs correlated with exposure to  
153 environmental contaminants was performed by Random Forests (RF) analysis (Breiman,  
154 2001). This analysis was based on the microbiota profile (genus-level relative abundance  
155 data) through the Random Forest package implemented in the R environment (R  
156 Development Core Team, 2008). RF use multiple learning algorithms to generate decision  
157 trees, while assigns a score of importance to each OTU, estimating the increase of the error  
158 caused by the removal of this OTU from the set of predictors. We considered a predictive  
159 OTUs if its score of importance is  $\geq 0.001$ . The relative importance of each OTU in the  
160 predictive model was assessed using the mean decreasing accuracy (MDA). Bootstrapping  
161 ( $n = 500$ ) was used to assess classification accuracy.

### 162 **3. Results**

#### 163 **3.1. Microbiota composition in the gut and the OTUs shared between the *P.*** 164 ***caudimaculatus* populations.**

165 We characterized the intestinal contents of wild *P. caudimaculatus* collected in two  
166 streams with distinct levels of contaminants. It was obtained a total of 4351 high-quality  
167 sequences from the thirty-one samples (16 reference and 15 polluted) used in this study. It  
168 was found a total of 41 OTUs classified in the genus level and distributed in eight phyla. One  
169 of those OTUs could not be identified in the genus level, totalizing 97.6 % of OTUs identified  
170 in the genus and phylum level. The most dominant phylum in the samples were  
171 Proteobacteria and Firmicutes. Proteobacteria presented a relative abundance of  $72.4 \pm 8.4$  %  
172 and  $74.4 \pm 8.4$  % in the reference and polluted streams, respectively. The Firmicutes  
173 presented a relative abundance of  $14.9 \pm 7.3$  % and  $15.7 \pm 7.7$  % in the reference and polluted  
174 streams, respectively (average  $\pm$  standard deviation) (Fig. 2A). At the genus level, the most  
175 dominant bacterial OTU in samples was *Burkholderia* with an relative abundance of around  
176  $39.4 \pm 14.6$  % in the reference stream and  $42.9 \pm 15.2$  in the polluted stream (average  $\pm$   
177 standard deviation) (Fig. 2B).

178 Considering the OTUs with prevalence equal or higher than 90% in the higher  
179 detection threshold of 0.1, the size of the microbiota is small, and formed by only two OTUs  
180 (*Burkholderia* and Not Assigned). Considering the OTUs with prevalence equal or higher  
181 than 90%, in the lower detection threshold of 0.001, we found 13 OTUs (31 % of the total of  
182 OTUs) that was shared considered all the studied samples ( $n=31$  guts of fish from reference  
183 and polluted stream) (Fig. 3). The 13 OTUs representing approximately one-third of the



184 OTUs were considered here as the core microbiota in the gut of *P. caudimaculatus*. Thus, the  
185 core microbiota was composed by the genus: *Burkholderia*, a Not Assigned OTU,  
186 *Streptococcus*, *Sphingonomas*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Acinetobacter*,  
187 *Proteus*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Bacteroides* and *Bradyrhizobium*.

### 188 **3.2. Decreased microbial diversity and the possible influence of the environmental** 189 **contaminants in microbial communities.**

190 Microbial diversity analysis was performed to evaluate differences in the gut  
191 microbiota of *P. caudimaculatus* from the reference and polluted streams. Fish from polluted  
192 stream showed lower microbial diversity compared to the reference stream in both the total  
193 number of observed species ( $p=0.0028$ ), and richness and evenness ( $p=0.0082$ ) (Fig. 4). Using  
194 dissimilarity matrices to evaluate the beta diversity, we found that the microbial communities  
195 were grouped differently depending on the origin of the *P. caudimaculatus* population  
196 (reference or polluted stream). The order analysis using a presence-absence of species (binary  
197 distance) showed that the microbial communities from the polluted stream were widely  
198 different from those found in the reference stream (Fig. 5A). However, when the relative  
199 abundance of the rate was taken into consideration (Bray-Curtis distance), few microbial  
200 communities remained distance, the distance between most of the microbial groups both the  
201 reference stream and the polluted stream was reduced, making the groups closer to each other  
202 (Fig. 5B). PerMANOVA analysis using the Adonis function (number of permutations: 999)  
203 was carried out using either binary or Bray-Curtis metrics and confirmed the difference  
204 between reference and polluted groups. The value of  $R^2$  (effect size) was 0.468 ( $p = 0.001$ ) for  
205 binary distance and 0.095 ( $p = 0.01$ ) for the distance of Bray- Curtis.

### 206 **3.3. Microbial OTUs correlated with exposure to environmental contaminants**

207 To associate bacterial OTUs with exposure to environmental contaminants, we used a  
208 biomarker screening analysis using Random Forests (RF). Our interest was the detection of  
209 microbial biomarkers differentiating fish from polluted stream versus reference stream. It  
210 were found 15 bacterial OTUs as the most important for classifying the samples from the  
211 polluted stream or reference stream (Fig. 6). The OTUs were classified according to mean  
212 decrease accuracy (MDA), when each OTUs had a score of importance that lost accuracy.  
213 Therefore, OTUs with large MDA values were more important for classification of OTU as a  
214 possible microbial biomarker of *P. caudimaculatus* exposure to environmental contaminants.  
215 OTUs identified as *Methylocaldum* and *Rhodobacter* had greatest MDA values ( $> 0.06$ )

216 associated with the polluted stream. Other OTUs identified as the genera *Micrococcus*,  
217 *Neisseria* and *Janibacter* were associated with the polluted stream, but presented MDA <0.06  
218 (Fig. 6). Furthermore, OTU identified to *Rhodoplanes* was highly associated with the  
219 reference stream (MDA > 0.06). Other OTUs with MDA <0.06 were also associated with the  
220 reference stream such as *Clostridium*, *Candidatus xiphinematobacter*, *Paucibacter*,  
221 *Candidatus korinobacter*, *Luteimonas*, *Stenotrophomonas*, *Dorea*, *Ruminococcus* and  
222 *Janthinobacterium* (Fig. 6). The different characteristics present in each stream seem to favor  
223 the appearance of possible microbial biomarkers of environmental quality.

#### 224 4. Discussion

225 By analyzing the gut microbiota of *P. caudimaculatus* in populations from streams  
226 with different anthropogenic impact, allowed us to: 1. Provide insight into the existence and  
227 dimensions of the common core microbiota that all samples share, 2. Associate environmental  
228 contamination with low microbial diversity, modifications in taxonomic composition and  
229 changes in structure community bacterial intestinal of the host, and 3. We additionally show  
230 that there are microbial groups could be potential biomarkers of exposure to contaminated  
231 environments.

##### 232 4.1. Core gut microbiota of *P. caudimaculatus*: Possible origin, defining size and 233 functional diversity.

234 It has been well known that the fish gut microbiota is dominated mostly by the  
235 Proteobacteria and Firmicutes phyla (Larsen et al., 2014; Li et al., 2014; Liu et al., 2016). The  
236 same phyla dominated the gut microbiota of *P. caudimaculatus*. One possible explanation is  
237 that the presence of some bacterial group could be determined by inherent factors from the  
238 host, such as genetics, anatomy or evolutionary (Goodrich et al., 2014, Roeselers et al., 2011).  
239 This would allow Proteobacteria and Firmicutes to be dominant in intestinal community of  
240 many fishes regardless of species and trophic level (Liu et al., 2016). Those phyla could be  
241 considered as "innate" bacterial group in the gut microbiota of fish because of they are  
242 registered as dominant in the larval stage (Rawls et al., 2006; Stephens et al., 2016) and  
243 throughout lifetime in some species (Yan et al., 2016). The dominant Phyla contain many  
244 clades that can be involved in important host gut functions, such as digestion, nutrient, thus  
245 and stability of the microbial community (Yang et al., 2019). Another important data from  
246 this research was to find *Burkholderia* as most dominant bacterial genus into intestines of all  
247 the studied samples. This is the first register of *Burkholderia* as the most dominant genus in

248 the microbiota of wild fish populations. The *Burkholderia* genus was recorded for the first  
249 time, as part of the gut microbiota of fish, about a decade ago (Nayak, 2010; Sun et al., 2009).  
250 Since then, the overall understanding of biological functions of *Burkholderia* into fishes gut is  
251 still rather rudimentary. There is still a lot to find out about the interaction between  
252 *Burkholderia* and the fish. This because of the *Burkholderia* genus contain clades that  
253 considered beneficial for host (Mahenthiralingam et al., 2005). Therefore, we suggest  
254 focusing on *Burkholderia* for future studies, since its exploration could reveal significant  
255 biological functions in the intestinal microbiota of these fish. In this study, emphasized the  
256 importance of the endogenous factor of host to determine some intestinal bacterial group. We  
257 suggest that the gut microbiota of *P. caudimaculatus* can be influenced by factors inherent to  
258 the host, such as genetics, anatomical or evolutionary (Roeselers et al., 2011). Previous  
259 studies (Funkhouser and Bordenstein, 2013) demonstrated that many organism, e.g. chickens,  
260 turtles and mammals, exhibit microbial maternal transmission or vertical transmission. A  
261 possible explication that the bacterial transmission in the livebearer fishes might be from  
262 mother to child during the embryonic development. The contact that occurs between eggs and  
263 the maternal body might increase their odds of transmission microbial.

264 Discovering similar bacterial OTUs in the gut microbiota of the same fish species  
265 from different populations and geographic locations indicates that these bacterial groups may  
266 be performing important biology functions to host (Roeselers et al., 2011). In the present  
267 study, we found that one-third of the total of OTUs (13 genus) were shared in all thirty-one  
268 samples. These OTUs might be playing a key role in the health *P. caudimaculatus*, it is thus  
269 likely that these shared OTUs might be considered essential to the gut microbiota. Recent  
270 studies in fish (Dehler et al., 2017; Roeselers et al., 2011; Star et al., 2013; Sullam et al.,  
271 2015; Wong and Rawls, 2012) showed that might there are different core sizes dependent on  
272 the similarity of OTUs abundances across communities. Analyses of OTUs composition is a  
273 way to define a core, the problem it can restrict the size core to an OTU subset within a  
274 specified abundance range (Shade and Handelsman, 2012). Last years, some authors (Salonen  
275 et al., 2012; Shetty et al., 2017) showed that the core size is conditional with the abundance  
276 and prevalence thresholds. They suggested not limited the core only with the most abundant  
277 OTUs, also with the most prevalent that is shared by many or all individuals. The results of  
278 this study were partially supported by Salonen et al. (2012) who indicated that one-third of the  
279 phylotypes shared among all samples can be considered seen as a conserved community that  
280 does not change with the genetic or dietary variation within individuals. Knowing the

281 microbial nucleus is very important because it allows us to define a stable and healthy  
282 bacterial community of the host (Shade and Handelsman, 2012).

283         Once determined the core size, the functional characterization can be focused on these  
284 salient microbiota members that possess the potential to benefit the fish health. Some of these  
285 bacteria as *Lactobacillus*, for example, correlated to normal gut microbiota in fishes and act in  
286 biological processes such as digestion, stress response and reproduction (Butt and Volkoff,  
287 2019). *Clostridium*, is an associated bacteria with cellulose-decomposing (Liu et al., 2016),  
288 *Bacteroides* produces vitamin B<sub>12</sub> (Tsuchiya et al., 2007). *Burkholderia* genus is a clade that  
289 present characteristics which could be helping the fishes to resist to some environmental  
290 contaminants, such as chemical substances (Rhodes and Schweizer, 2016), insecticide (Itoh et  
291 al., 2018) and hydrocarbons (Yang et al., 2016). As this genus was not assigned as  
292 overexpress in the contaminated stream population, its presence on the core microbiota may  
293 indicate a coevolution with *P. caudimaculatus* as a mechanism of protection for these  
294 animals. Actually, there are many bacterial used commonly as probiotics in aquaculture  
295 (Carnevali et al., 2017), these bacterial genera can be increasing the number of beneficial gut  
296 bacteria to fish (Siriappagounder et al., 2018). On the other hand, some members of the core  
297 microbiota have very few available information about functional importance. It is important  
298 to characterize these genera and function future works because those bacterial groups could be  
299 participating in another important biological process by the fishes, e.g. adaptation and  
300 evolution (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008).

#### 301         **4.2. Anthropic contamination causes loss of microbial diversity and alterations in the** 302         **microbial community**

303         In the present study, founded correlated between loss bacterial diversity and fish  
304 inhabitant fish into the urban stream with a high level of environmental contaminant. This  
305 result is agreement with previous studies (Evariste et al., 2019). They demonstrated that many  
306 environmental contaminants of anthropogenic origin causes loss diversity and alterations in the  
307 microbial community intestinal of aquatic organism. The history of contamination of the  
308 urban stream with urban and industrial waste (Medeiros et al., 2005) led to had its higher  
309 levels of PAH in the sediment compared with the reference stream (Chivittz et al., 2016),  
310 which could possibly explain the loss of bacterial diversity of fish. Persistent organic  
311 pollutants, such as PAHs, to be in the list of environmental pollute that causes alter into the  
312 gut microbiome of the host (Jin et al., 2017). A Recent study (Giang et al., 2018) have

313 reported that wild fish exposed under fully natural conditions to the anthropic waste had  
314 consequences into the intestinal microbiome composition. The anthropic waste could contain  
315 a diversity of compounds, for example, pharmacological compounds, personal care products,  
316 agrotoxics and many other that could lead to negative effects in the microbial leading to the  
317 diversity loss observed. Therefore, we suggest that the loss of intestinal microbial diversity  
318 could represent a direct effect of environmental contamination observed in the polluted site.

319 The beta-diversity metrics plotted by PCoA indicated that the bacterial community of  
320 the fish from the two sites differed by both absence/presence (i.e. binary distances metric) and  
321 species abundance (i.e. Bray-Curtis metric). It is possible that the environmental quality in  
322 each stream influenced dissimilarity of intestinal microbial communities among the fish  
323 population. The differences in community composition between microbial groups is most  
324 likely a reflection of the environment around the host, as previously suggested (Nayak, 2010).  
325 Previous studies have reported that the environment plays a large role in shaping intestinal  
326 microbial community but there are other factors that help to its shaping, such as host selective  
327 processes (Eichmiller et al., 2016; Roeselers et al., 2011; Sullam et al., 2012). This last most  
328 likely is involved in establishment of the gut microbiota (Roeselers et al., 2011). We suppose  
329 that the environmental quality influences the development of other bacteria groups that could  
330 colonize the fish intestines. This would explain the difference between the intestinal microbial  
331 communities of the *P. caudimaculatus* population. It is clear that when the host is exposed to  
332 different external factors, such as environmental contaminants, present microbial dysbiosis  
333 (Evariste et al., 2019; Jin et al., 2017; Teyssier et al., 2018). So far, little importance was  
334 given to the alterations caused by anthropic waste in the gut microbiota of fish wild (Giang et  
335 al., 2018). The most studies performed in fish in-situ relate anthropic waste with genetic,  
336 behavioral and biomarker alterations (Ballesteros et al., 2017; Kim and Jung, 2016; Mccallum  
337 et al., 2016). Showed another possible effect of environmental contaminants from anthropic  
338 waste. The environmental contaminants not only alter the aquatic ecosystems, but also causes  
339 subtle modifications in the organisms, such as the loss of intestinal microbial diversity in  
340 fishes. We suggest considering the loss and alteration of the gut microbiota of fish as a sign of  
341 other possible effects related to urban waste. Our results provide answers, on a yet little  
342 considered perspective, about the negative consequences of the environmental contamination  
343 for the intestinal microbiota of fish that live in industrial areas.

344

### 345           **4.3. Potential microbial biomarkers of environmental contaminants**

346           So far, accumulating data indicate that individuals cannot be considered independently  
347 of the gut microbiota they harbor. Studies showed that there is a strong communicates  
348 between Host-gut microbiota (Cryan and Dinan, 2012; Pérez et al., 2010). Recently,  
349 systematic reviews confirming that the intestinal microbial communities play a key role in  
350 many essential biological functions to fishes (Wang et al., 2018). In addition, showed that the  
351 gut microbiota is very sensitive to many environmental contaminants and that disturbances  
352 induced in it lead to altering the health of the host (Evariste et al., 2019). Assumed that a  
353 biomarker is a biological response measured in the products of an organism, such as feces  
354 (Van Gestel and Van Brummelen, 1996). Recent years, many studies suggested using the gut  
355 microbiota as a biomarker to document adverse effects in the health of the host (Duranti et al.,  
356 2016; Mancabelli et al., 2017). Suggested using the term microbial biomarkers refer to the  
357 biological response that is linked to the exposure of environmental contaminants. Most of the  
358 studies in ecotoxicology of fishes used biomarkers to evaluate the exposure of individuals to  
359 environmental contaminants based primarily on chemical, histopathological, biochemical and  
360 genetic analyses (De la Torre et al., 2007; Lee et al., 2015; Ossana et al., 2016; Santana et al.,  
361 2018; Van der Oost et al., 2003). In this study, we showed for the first time that there are  
362 bacterial groups intestinal can be used as potential biomarkers of exposure to environmental  
363 contaminants. This bacterial group is associated with impacted environments. *Methylocaldum*  
364 and *Rhodobacter* are correlated strongly with the *P. caudimaculatus* populations from the  
365 polluted stream, this suggested its use as microbial biomarkers of exposure. The  
366 *Methylocaldum* are methanotrophic bacteria that use methane as a sole source of carbon and  
367 energy (Bodrossy et al., 1997). Our result on *Methylocaldum* is surprising because this  
368 bacterial genus normally is associated with polluted environments by hydrocarbons residual.  
369 Moreover, *Methylocaldum* occasionally develops in environments with high temperatures,  
370 between 40 and 50 ° C (Bodrossy et al., 1997; Cvejic et al., 2000; Saidi-Mehrabad et al.,  
371 2013). *Rhodobacter* is a bacterium that is widely distributed from marine environments to  
372 freshwater. In addition, this bacterial have been related to processes of anoxygenic  
373 photosynthesis, carbon fixation and nitrogen (Mackenzie et al., 2007; Masepohl and  
374 Hallenbeck, 2010). It is very important to inform that this bacterium can be harmful to fish.  
375 *Rhodobacter* is related to microbial dysbiosis in zebrafish induced by polystyrene  
376 microplastics. Until now, this is the first register where microbial biomarkers from the  
377 intestinal microbiota of fish were used to measure the effect of the environmental

378 contamination in the aquatic ecosystems. The presence of these two genera would indicate an  
379 aquatic environment contaminate by anthropogenic residues and petrogenic compounds, e.g.  
380 PAHs. This coincides with the historical contamination that presents the polluted stream, by  
381 urban sewage and industrial effluents (Medeiros et al., 2005). It is possible that our findings  
382 for biomarkers may represent a new functional attribution or that we discovered a new  
383 ecological niche for these groups *Methylocaldum* and *Rhodobacter*.

## 384 **5. Conclusion**

385 This study provided evidence that the fishes wild exposed to the environmental  
386 contamination present changes in the intestinal microbiota. It is likely that the composition  
387 and structure of the intestinal microbial communities of *P. caudimaculatus* are under the  
388 influence of the environmental contaminants. Our research provides the first evidence of the  
389 microbiota core of the *Phalloceros caudimaculatus*, which may be constituted by 13 bacterial  
390 OTUs. We found out that the *Methylocaldum* and *Rhodobacter* genus may be considered as  
391 possible microbial biomarkers associates to exposure of environmental contaminants.

392

## 393 **Acknowledgements**

394 This research was supported in part by the International Foundation for Science, Stockholm,  
395 Sweden, through a grant to Juliano Zanette (IFS I-2-A/5350-2) and Coordenação de  
396 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. JZ and  
397 LFWR are productivity research fellow from CNPq (PQ 309605/2017-2 and 479133/2012-3,  
398 respectively) (Brazil).

399

400 **References**

- 401 Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic  
402 hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–  
403 114. <https://doi.org/10.1002/em.20095>
- 404 Ballesteros, M., Rivetti, N., Morillo, D., Bertrand, L., Amé, M., Bistoni, M., 2017. Multi-  
405 biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in  
406 rivers with mixtures of environmental contaminants. *Sci. Total Environ.* 595, 711–722.  
407 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.203>
- 408 Bodrossy, L., Holmes, E.M., Holmes, A.J., Kovács, K.L., Murrell, J.C., 1997. Analysis of  
409 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of  
410 thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. *Arch.*  
411 *Microbiol.* 168, 493–503. <https://doi.org/10.1007/s002030050527>
- 412 Breiman, L., 2001. Random Forests. *Mach Learn* 45, 5–32.  
413 <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- 414 Butt, R.L., Volkoff, H., 2019. Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Front.*  
415 *Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- 416 Carnevali, O., Maradonna, F., Gioacchini, G., 2017. Integrated control of fish metabolism,  
417 wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472, 144–155.  
418 <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.03.037>
- 419 Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K.,  
420 Fierer, N., Pěa, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights,  
421 D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M.,  
422 Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T.,  
423 Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community  
424 sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- 425 Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens,  
426 S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R.,  
427 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and  
428 MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- 429 Chivittz, C.C., Pinto, D.P., Ferreira, R.S., Sopezki, M. da S., Fillmann, G., Zanette, J., 2016.



430 Responses of the CYP1A biomarker in *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros*  
431 *caudimaculatus* and evaluation of a CYP1A refractory phenotype. *Chemosphere* 144,  
432 925–931. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.050>

433 Clements, K.D., 1997. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes, in:  
434 *Gastrointestinal Microbiology*. Springer US, Boston, MA, pp. 156–198.  
435 [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4111-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4111-0_6)

436 Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut  
437 microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701–712.  
438 <https://doi.org/10.1038/nrn3346>

439 Cvejic, J.H., Bodrossy, L., Kovács, K.L., Rohmer, M., 2000. Bacterial triterpenoids of the  
440 hopane series from the methanotrophic bacteria *Methylocaldum* spp.: phylogenetic  
441 implications and first evidence for an unsaturated aminobacteriohopanepolyol. *FEMS*  
442 *Microbiol. Lett.* 182, 361–365. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08922.x>

443 De la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L., 2007. Assessment of the pollution impact on  
444 biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582–1590.  
445 <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.02.033>

446 Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2017. Environmental and physiological factors  
447 shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 467,  
448 149–157. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.07.017>

449 Duranti, S., Gaiani, F., Mancabelli, L., Milani, C., Grandi, A., Bolchi, A., Santoni, A., Lugli,  
450 G.A., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Bertoni, S., Vivo, V., Serafini, F.,  
451 Barbaro, M.R., Fugazza, A., Barbara, G., Gioiosa, L., Palanza, P., Cantoni, A.M.,  
452 de'Angelis, G.L., Barocelli, E., de'Angelis, N., van Sinderen, D., Ventura, M., Turrone,  
453 F., 2016. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: Bifidobacteria as novel  
454 microbial biomarkers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw191.  
455 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw191>

456 Edgar, R.C., 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon  
457 reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

458 Eichmiller, J.J., Hamilton, M.J., Staley, C., Sadowsky, M.J., Sorensen, P.W., 2016.  
459 Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome* 44.  
460 <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0190-1>

- 461 Evariste, L., Barret, M., Mottier, A., Mouchet, F., Gauthier, L., Pinelli, E., 2019. Gut  
462 microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies. Environ.  
463 Pollut. 248, 989–999. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.02.101>
- 464 Funkhouser, L.J., Bordenstein, S.R., 2013. Mom knows best: The universality of maternal  
465 microbial transmission. PLoS Biol. 11, e1001631.  
466 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
- 467 Garcia, M.R., Mirlean, N., Baisch, P.R., Caramão, E.B., 2010. Assessment of polycyclic  
468 aromatic hydrocarbon influx and sediment contamination in an urbanized estuary.  
469 Environ. Monit. Assess. 168, 269–276. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1110-7>
- 470 Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K.J., 2015. A new view of the fish gut microbiome:  
471 Advances from next-generation sequencing. Aquaculture 448, 464–475.  
472 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- 473 Giang, P.T., Sakalli, S., Fedorova, G., Tilami, S.K., Bakal, T., Najmanova, L., Grabicova, K.,  
474 Kolarova, J., Sampels, S., Zamaratskaia, G., Grabic, R., Randak, T., Zlabek, V., Burkina,  
475 V., 2018. Biomarker response, health indicators, and intestinal microbiome composition  
476 in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario L.*) exposed to a sewage treatment plant  
477 effluent-dominated stream. Sci. Total Environ. 625, 1494–1509.  
478 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.020>
- 479 Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of population  
480 Parameters. Biometrika. <https://doi.org/10.2307/2333344>
- 481 Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont,  
482 M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G., Ley, R.E., 2014.  
483 Human genetics shape the gut microbiome. Cell 159, 789–799.  
484 <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.09.053>
- 485 Hu, Y., Cheng, H., 2013. Water pollution during China's industrial transition. Environ. Dev.  
486 8, 57–73. <https://doi.org/10.1016/J.ENVDEV.2013.06.001>
- 487 Itoh, H., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., Tago, K., Hayatsu, M., Kikuchi, Y., 2018.  
488 Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to  
489 insecticide spraying. Isme J. 12, 909–920. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0021-9>
- 490 Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z., 2018. Polystyrene microplastics induce

- 491 microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environ. Pollut.* 235,  
492 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>
- 493 Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z., Fu, Z., 2017. Effects of environmental pollutants on gut microbiota.  
494 *Environ. Pollut.* 222, 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.045>
- 495 Kan, H., Zhao, F., Zhang, X.-X., Ren, H., Gao, S., 2015. Correlations of gut microbial  
496 community shift with hepatic damage and growth inhibition of *Carassius auratus*  
497 induced by Pentachlorophenol exposure. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11894–11902.  
498 <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02990>
- 499 Kim, W.-K., Jung, J., 2016. In situ impact assessment of wastewater effluents by integrating  
500 multi-level biomarker responses in the pale chub (*Zacco platypus*). *Ecotoxicol. Environ.*  
501 *Saf.* 128, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.028>
- 502 Larsen, A.M., Mohammed, H.H., Arias, C.R., 2014. Characterization of the gut microbiota of  
503 three commercially valuable warmwater fish species. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1396–  
504 1404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>
- 505 Lee, J.W., Won, E.-J., Raisuddin, S., Lee, J.-S., 2015. Significance of adverse outcome  
506 pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. *J.*  
507 *Environ. Sci.* 35, 115–127. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2015.05.002>
- 508 Lemos, L.N., Fulthorpe, R.R., Triplett, E.W., Roesch, L.F.W., 2011. Rethinking microbial  
509 diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J. Microbiol. Methods* 86, 42–  
510 51. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.03.014>
- 511 Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., Zhang, T., Yu, Y., Yan, Q., 2014. Comparative  
512 study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *J.*  
513 *Appl. Microbiol.* 117, 1750–1760. <https://doi.org/10.1111/jam.12663>
- 514 Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut  
515 microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by  
516 their trophic levels. *Sci. Rep.* 6, 24340. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- 517 Mackenzie, C., Eraso, J.M., Choudhary, M., Roh, J.H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, Á.,  
518 Kaplan, S., 2007. Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annu. Rev.*  
519 *Microbiol.* 61, 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093402>

- 520 Mahenthiralingam, E., Urban, T.A., Goldberg, J.B., 2005. The multifarious, multireplicon  
521 Burkholderia cepacia complex. Nat. Rev. Microbiol. 3, 144–156.  
522 <https://doi.org/10.1038/nrmicro1085>
- 523 Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G.A., Turrone, F., Cocconi, D., van Sinderen, D., Ventura,  
524 M., 2017. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human  
525 intestinal diseases by meta-analysis. FEMS Microbiol. Ecol. 93.  
526 <https://doi.org/10.1093/femsec/fix153>
- 527 Masepohl, B., Hallenbeck, P.C., 2010. Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation  
528 in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Springer, New York, NY, pp.  
529 49–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_4)
- 530 McCallum, E.S., Du, S.N.N., Vaseghi-Shanjani, M., Choi, J.A., Warriner, T.R., Sultana, T.,  
531 Scott, G.R., Balshine, S., 2016. In situ exposure to wastewater effluent reduces survival  
532 but has little effect on the behaviour or physiology of an invasive Great Lakes fish.  
533 Aquat. Toxicol. 184, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.017>
- 534 McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., Desantis, T.Z., Probst, A.,  
535 Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P., 2012. An improved Greengenes taxonomy  
536 with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea.  
537 ISME J. 6, 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- 538 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive  
539 Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One 8, e61217.  
540 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- 541 Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelao, R.M., Del Rosso, C., Fillmann, G., Zamboni, A.J.,  
542 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon  
543 Estuary, Brazil. Environ. Int. 31, 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2004.07.001>
- 544 Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquac. Res. 41, 1553–1573.  
545 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- 546 Ndiaye, A., Sanchez, W., Durand, J.D., Budzinski, H., Palluel, O., Diouf, K., Ndiaye, P.,  
547 Panfili, J., 2012. Multiparametric approach for assessing environmental quality  
548 variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia  
549 (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 4133–

550 4147. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0979-9>

551 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson,  
552 G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. Vegan: Community Ecology  
553 Package. R Packag. version 2.3-1. <https://doi.org/10.4135/9781412971874.n145>

554 Ossana, N.A., Eissa, B.L., Baudou, F.G., Castañé, P.M., Soloneski, S., Ferrari, L., 2016.  
555 Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus*  
556 (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 73–  
557 81. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2016.06.046>

558 Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Múzquiz,  
559 J.L., 2010. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal*  
560 *Immunol.* 3, 355–360. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>

561 Pylro, V.S., Morais, D.K., de Oliveira, F.S., dos Santos, F.G., Lemos, L.N., Oliveira, G.,  
562 Roesch, L.F.W., 2016. BMPOS: a flexible and user-friendly tool sets for microbiome  
563 studies. *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0785-x>

564 Pylro, V.S., Roesch, L.F.W., Morais, D.K., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Tótola, M.R., 2014.  
565 Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms.  
566 *J. Microbiol. Methods.* <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.018>

567 R Development Core Team, 2008. *R: A Language and Environment for Statistical*  
568 *Computing.* Available at:<http://www.R-project.org>

569 Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Ley, R.E., Gordon, J.I., 2006. Reciprocal gut microbiota  
570 transplants from Zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection.  
571 *Cell* 127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043>

572 Rhodes, K.A., Schweizer, H.P., 2016. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug*  
573 *Resist. Updat.* <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.003>

574 Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K.,  
575 Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 5, 1595–  
576 1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>

577 Saidi-Mehrabad, A., He, Z., Tamas, I., Sharp, C.E., Brady, A.L., Rochman, F.F., Bodrossy,  
578 L., Abell, G.C.J., Penner, T., Dong, X., Sensen, C.W., Dunfield, P.F., 2013.  
579 Methanotrophic bacteria in oilsands tailings ponds of northern Alberta. *ISME J.* 7, 908–

580 921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.163>

581 Salonen, A., Salojärvi, J., Lahti, L., de Vos, W.M., 2012. The adult intestinal core microbiota  
582 is determined by analysis depth and health status. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 16–20.  
583 <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03855.X>

584 Santana, M.S., Sandrini-Neto, L., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., Di Domenico, M.,  
585 Prodocimo, M.M., 2018. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic  
586 hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* 242, 449–  
587 461. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.07.004>

588 Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome.  
589 *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>

590 Shetty, S.A., Hugenholtz, F., Lahti, L., Smidt, H., de Vos, W.M., 2017. Intestinal microbiome  
591 landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial  
592 modulation strategies. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 182–199.  
593 <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw045>

594 Siriyappagouder, P., Galindo-Villegas, J., Lokesh, J., Mulero, V., Fernandes, J.M.O., Kiron,  
595 V., 2018. Exposure to Yeast Shapes the Intestinal Bacterial Community Assembly in  
596 Zebrafish Larvae. *Front. Microbiol.* 9, 1868. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01868>

597 Star, B., Haverkamp, T.H., Jentoft, S., Jakobsen, K.S., 2013. Next generation sequencing  
598 shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod  
599 caught at a single location. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-248>

600 Stephens, W.Z., Burns, A.R., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J.F., Guillemin, K., Bohannan,  
601 B.J.M., 2016. The composition of the Zebrafish intestinal microbial community varies  
602 across development. *ISME J.* 10, 644–654. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.140>

603 Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O’connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R.,  
604 Kilham, S.S., Russell, J.A., 2012. Environmental and ecological factors that shape the  
605 gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol. Ecol.* 21, 3363–3378.  
606 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>

607 Sullam, K.E., Rubin, B.E., Dalton, C.M., Kilham, S.S., Flecker, A.S., Russell, J.A., 2015.  
608 Divergence across diet, time and populations rules out parallel evolution in the gut  
609 microbiomes of Trinidadian guppies. *ISME J.* 9, 1508–1522.

610 <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.231>

611 Sun, Y., Yang, H., Ling, Z., Chang, J., Ye, J., 2009. Gut microbiota of fast and slow growing  
612 grouper *Epinephelus coioides*. *African J. Microbiol. Res.* 3, 713–720.

613 Teyssier, A., Rouffaer, L.O., Saleh Hudin, N., Strubbe, D., Matthysen, E., Lens, L., White, J.,  
614 2018. Inside the guts of the city: Urban-induced alterations of the gut microbiota in a  
615 wild passerine. *Sci. Total Environ.* 612, 1276–1286.  
616 <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.035>

617 Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H., 2007. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*,  
618 an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.*  
619 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>

620 Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in  
621 environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.  
622 [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

623 Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in  
624 ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217–225.  
625 <https://doi.org/10.1007/BF00118992>

626 Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota  
627 research. *Rev. Aquac.* 10, 626–640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>

628 Wong, S., Rawls, J.F., 2012. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host  
629 ecology and environment. *Mol. Ecol.* 21, 3100–3102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05646.x>

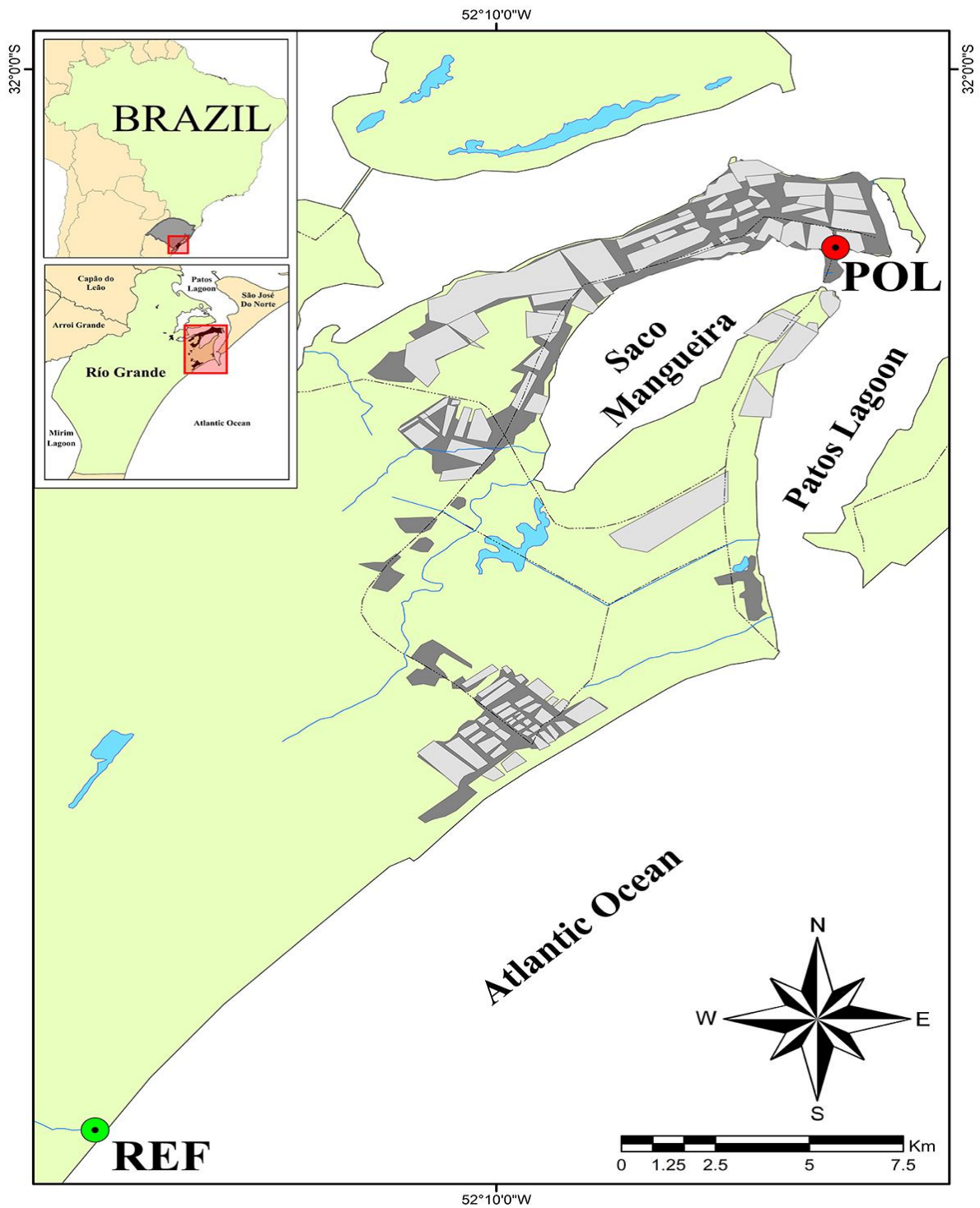
631 Yan, Q., Li, J., Yu, Y., Wang, J., He, Z., Van Nostrand, J.D., Kempfer, M.L., Wu, L., Wang,  
632 Y., Liao, L., Li, X., Wu, S., Ni, J., Wang, C., Zhou, J., 2016. Environmental filtering  
633 decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environ. Microbiol.*  
634 18, 4739–4754. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13365>

635 Yang, G., Jian, S.Q., Cao, H., Wen, C., Hu, B., Peng, M., Peng, L., Yuan, J., Liang, L., 2019.  
636 Changes in microbiota along the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*):  
637 Community, interspecific interactions, and functions. *Aquaculture* 498, 151–161.  
638 <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.08.062>

- 639 Yang, S., Wen, X., Shi, Y., Liebner, S., Jin, H., Perfumo, A., 2016. Hydrocarbon degraders  
640 establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil  
641 contamination in permafrost environments. *Sci. Rep.* 6, 37473.  
642 <https://doi.org/10.1038/srep37473>
- 643 Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2017. Effect of  
644 dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions  
645 of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie*  
646 *Van Leeuwenhoek* 110, 501–513. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>
- 647 Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of  
648 animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–  
649 735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>
- 650

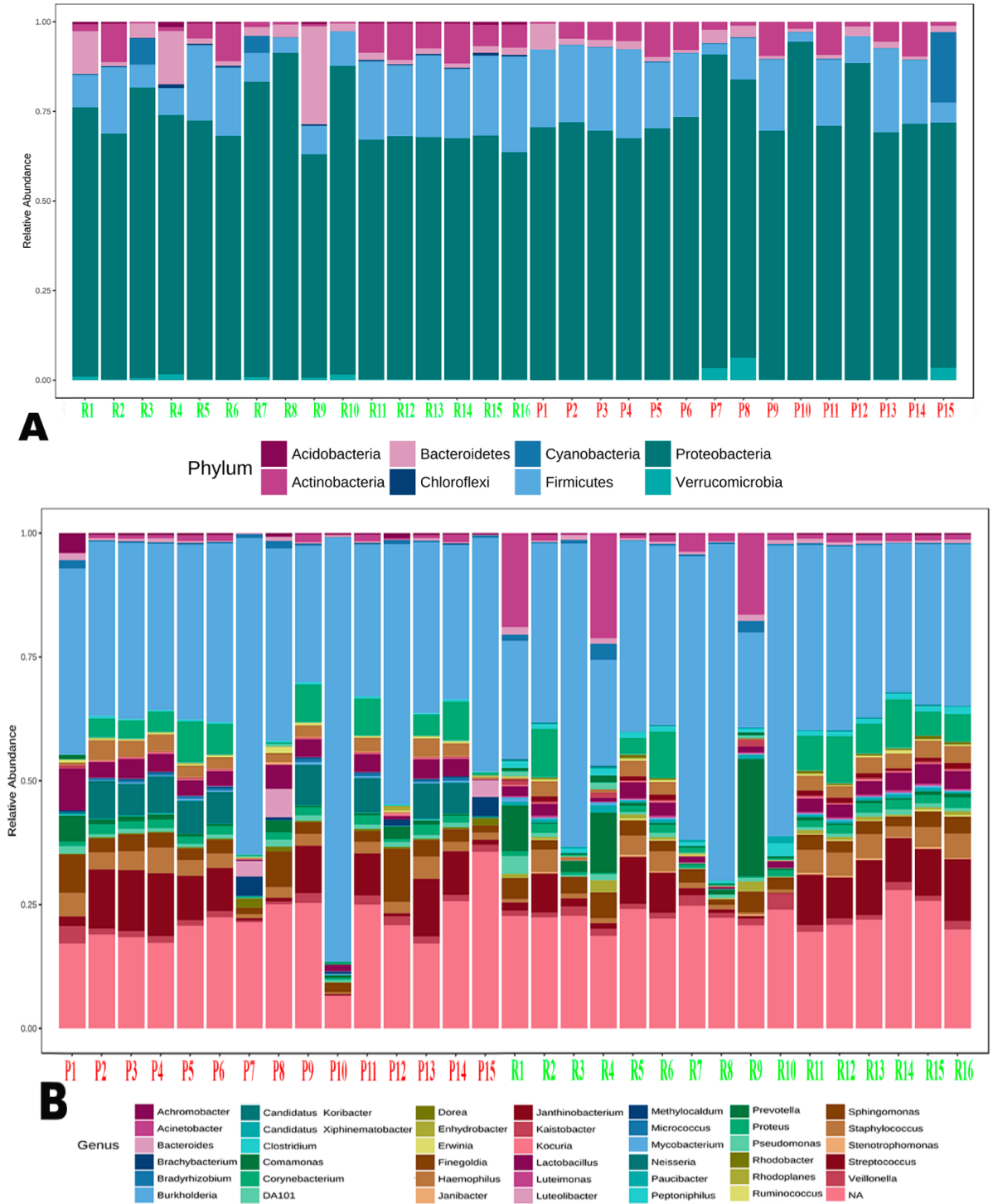


## FIGURE CAPTIONS

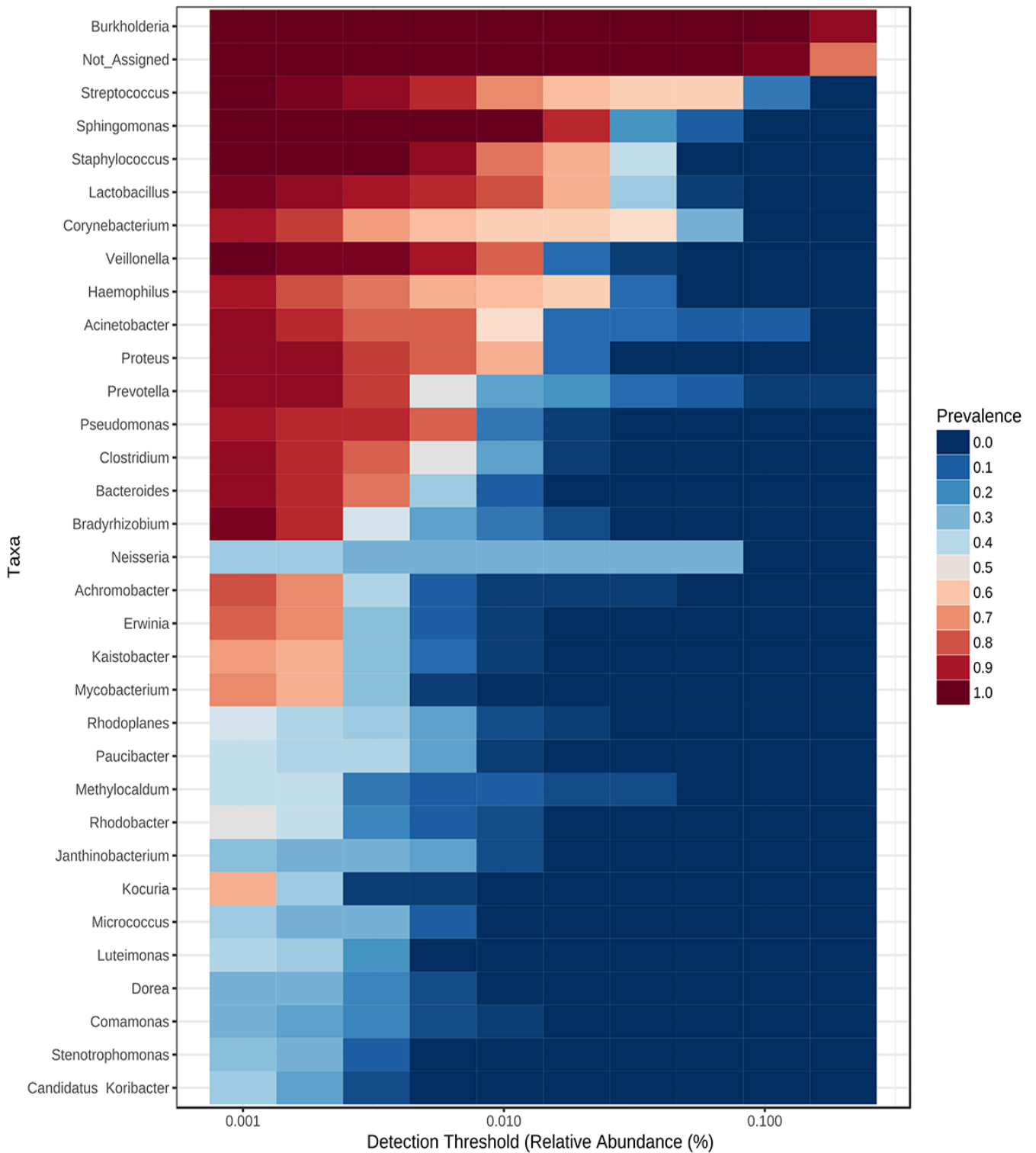


652

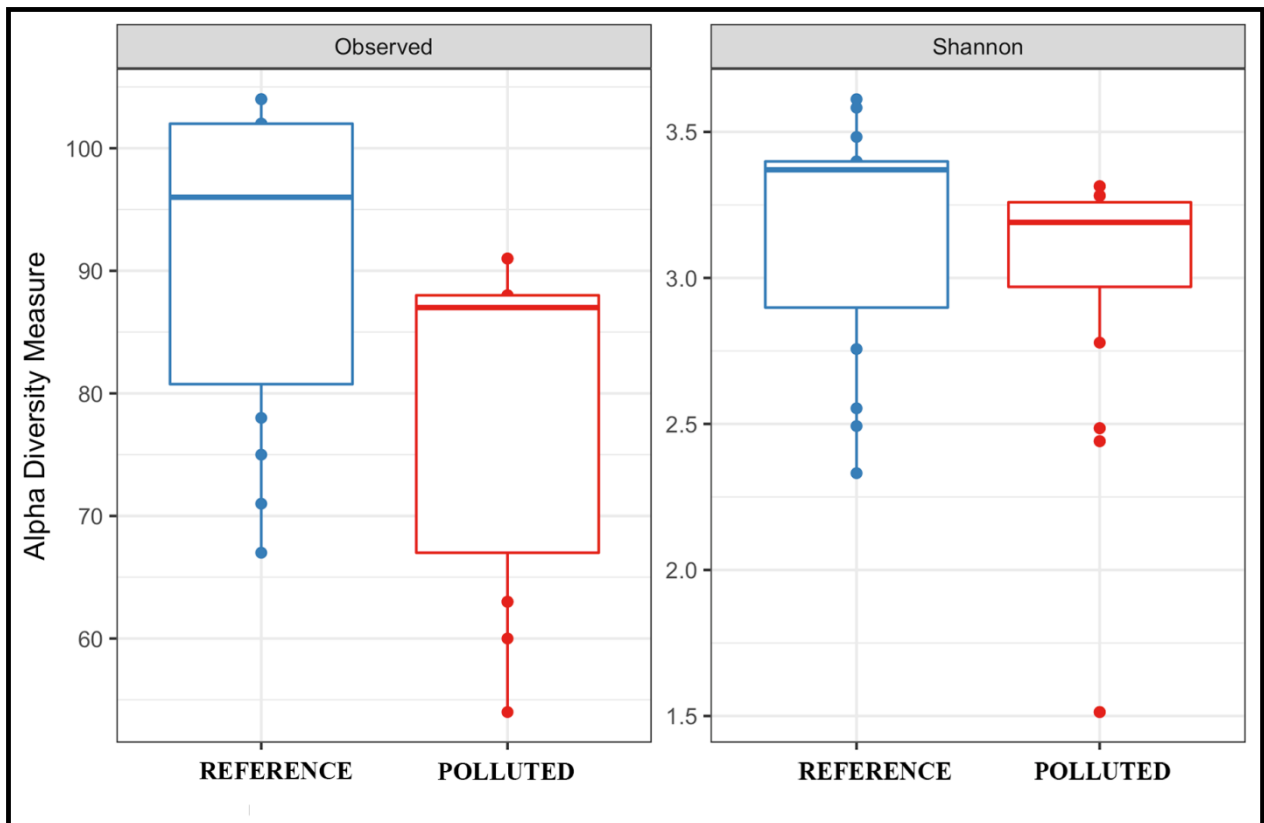
653 **Fig. 1.** Study area. Sampling sites of *Phalloceros caudimaculatus* in the polluted stream  
 654 (POL) and the reference stream (REF) in the city of Rio Grande, RS, Brazil. The POL site is  
 655 located between a highly urbanized area and an industrial area (gray area).



656 **Fig. 2.** Microbiota composition of *P. caudimaculatus* populations. Bar graphs OTUs-based  
 657 showing: A. Relative abundance of bacterial phyla in the intestinal microbiota of each fish. B.  
 658 Relative abundances at genera level of each *P. caudimaculatus* fish. We Analyzed samples  
 659 both the reference stream (R1 – R16, green color) as polluted stream (P1-P15, red color).

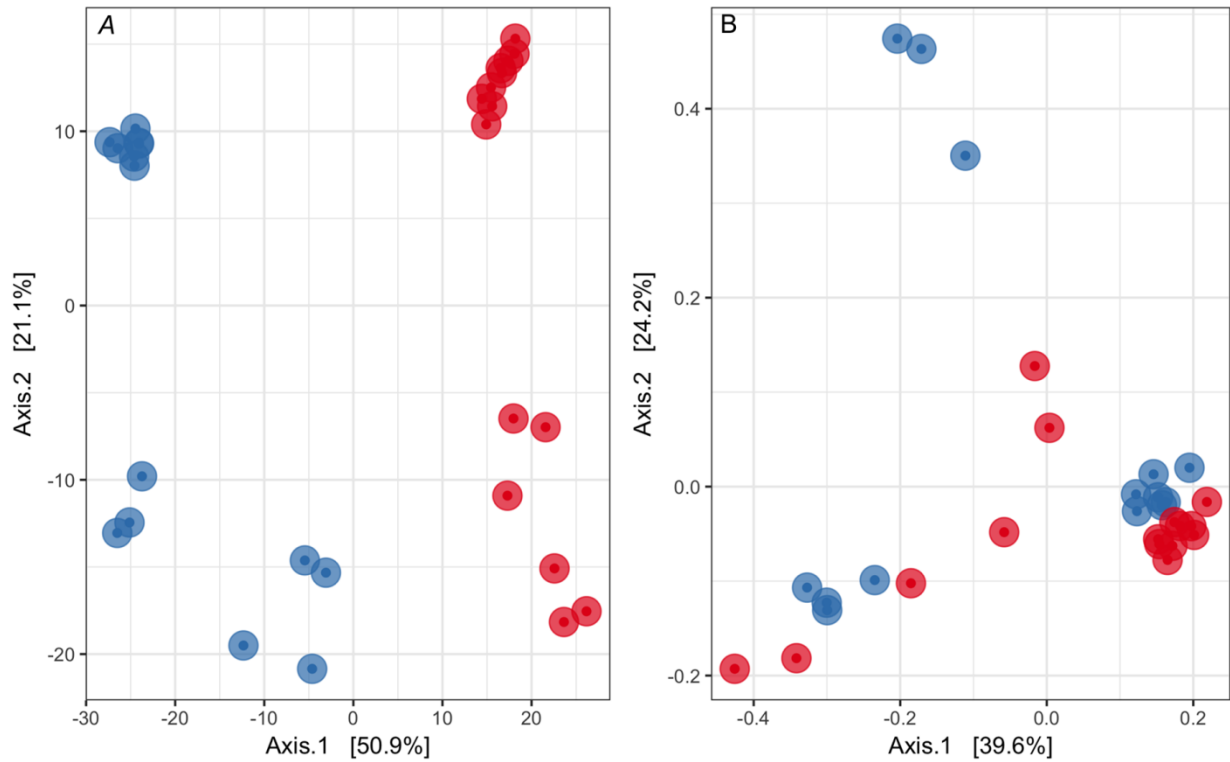


660 **Fig. 3.** Core microbiota. Heatmap showing the prevalence of the microbiota taxa in the gut of  
 661 *Phalloceros caudimaculatus* that presented the detection threshold (relative abundance, %)   
 662 equal or higher than 0.001. The prevalence varies from 0 % (blue,  $value_{min} = 0.0$ ) to 100 %   
 663 (red,  $value_{max} = 1.0$ ) in the gut samples (n= 31 fish total).  
 664



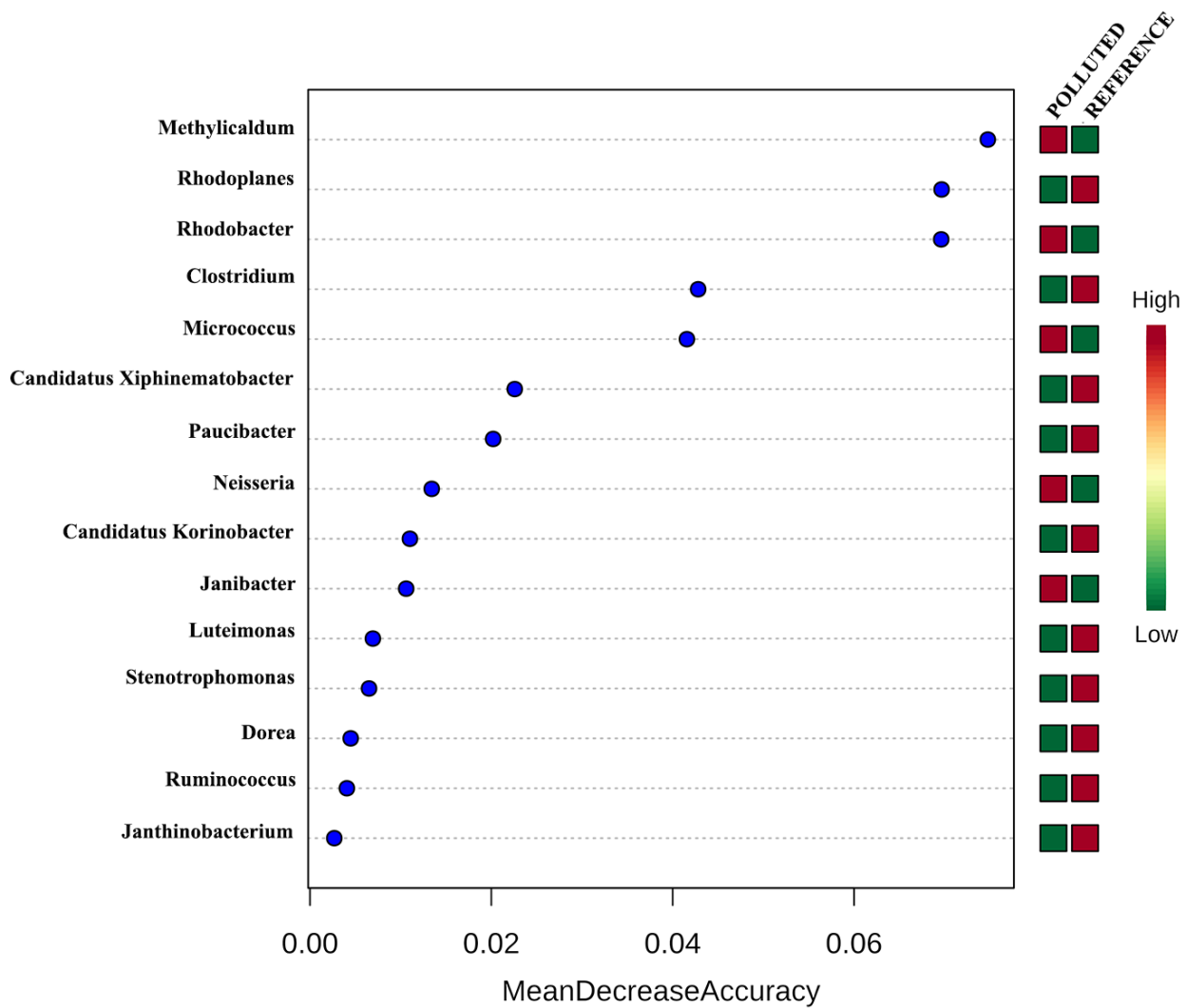
665 **Fig. 4.** Alpha diversity of the two *P. caudimaculatus* population. Observed diversity = total  
 666 number of OTUs observed ( $p=0.0028$ ), and Shannon diversity ( $p=0.0082$ ). The boxes cover  
 667 the first to the third quartile; the horizontal line inside the boxes represents the median.  
 668 Whiskers extending vertically from the boxes indicate variability outside the upper and lower  
 669 quartiles, the single red and blue circles indicate outliers.

670



671 **Fig. 5.** Comparisons of microbial communities based on principal coordinate analysis (PCoA)  
 672 by distance metrics of binary distances metrics (A) and Bray-Curtis(B). Each point represents  
 673 a microbial community and the blue and red points represent the reference and polluted  
 674 streams, respectively. Closer points represent similar microbial communities, while the more  
 675 distant points represent different microbial communities. It was tested the statistical  
 676 significance of the groupings of samples with the Adonis function, using the distance  
 677 matrices. The R2 values were 0.468 ( $p = 0.001$ ) for binary distance metrics and 0.095 ( $p =$   
 678 0.01) for Bray-Curtis distance metrics.

679



680 **Fig. 6.** Microbial Biomarkers. The most important bacterial genera for the prediction of  
 681 microbial biomarkers for characterization of streams according to the analysis of Random  
 682 Forests. Higher values of mean decrease in accuracy indicate OTUs that are more important to  
 683 the classification. All OTUs with an importance score >0.001 are listed.

684

685 **Highlights**

686

687

688

689

690

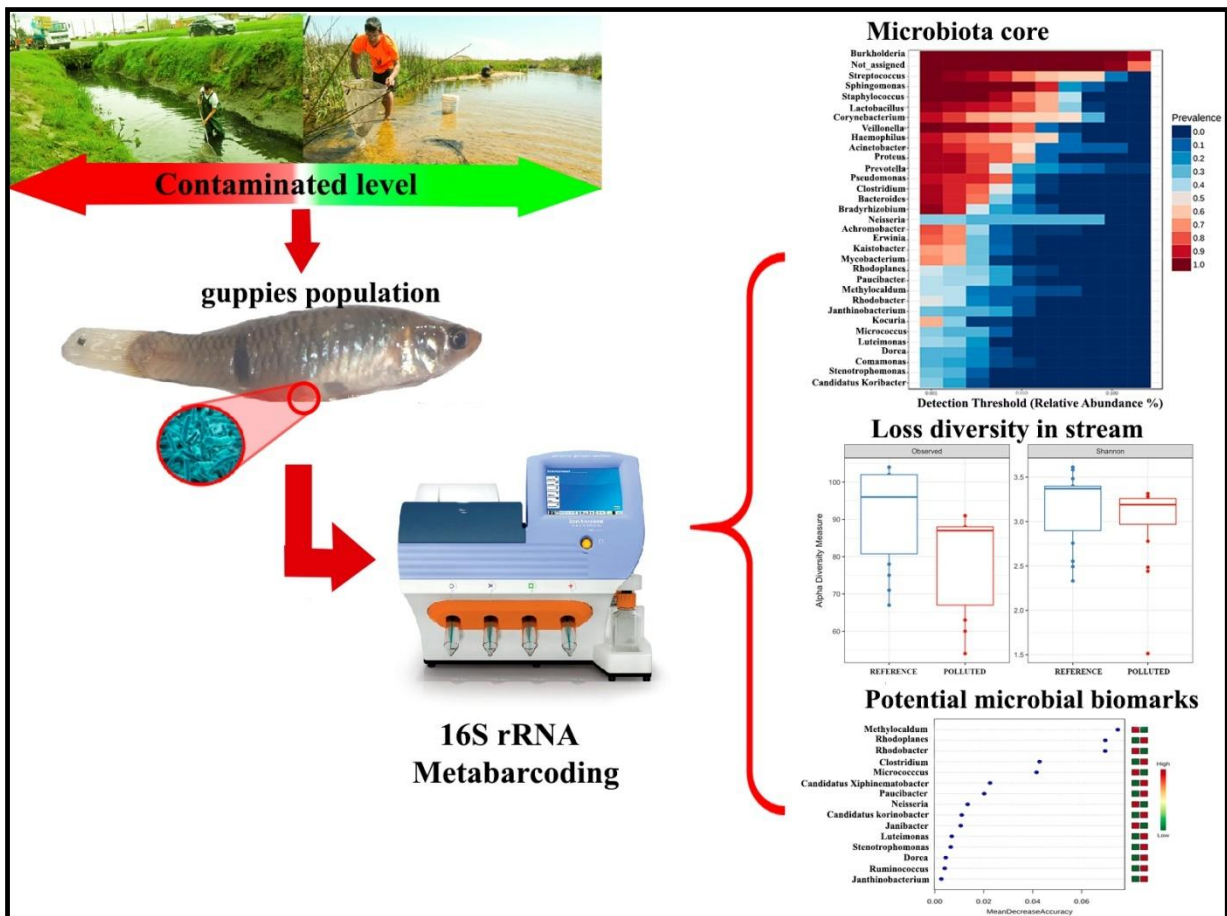
691

692

- 16S rRNA metabarcoding was used to characterize the gut microbiota in fish
- The core microbial community in the gut of *Phalloceros caudimaculatus* was identified
- The microbial diversity in gut of fish is lower in an urban than a reference stream
- The gut microbiota community in fish correlates with the environmental contamination
- *Methylocaldum* and *Rhodobacter* could represent potential environmental biomarkers

693 **Graphical abstract**

694



695

696

697  
698

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

699         A presente dissertação teve como objetivo avaliar os impactos dos contaminantes  
700 ambientais na microbiota intestinal dos peixes. Para isso, foi utilizado um enfoque  
701 metagenômico para caracterizar e comparar as comunidades microbianas intestinais de duas  
702 populações diferentes de peixe guarú *P. caudimaculatus*. Os resultados mostraram que o  
703 guarú é um bom modelo para estudos toxicológicos, pois respondem de maneira positiva à  
704 exposição *in situ* dos contaminantes ambientais. O estudo com *P. caudimaculatus* auxiliou na  
705 melhor compreensão das relações microbiota-hospedeiro. Assim, nós sugerimos seguir a  
706 mesma perspectiva usada em *P. caudimaculatus* em outros peixes selvagens que habitam os  
707 riachos urbanos contaminados.

708         A associação entre a contaminação ambiental com a perda da diversidade e alteração  
709 nas comunidades microbianas é um sinal que problemas maiores poderiam estar ocorrendo  
710 com o hospedeiro. A microbiota intestinal cumpre um papel importante na saúde do  
711 hospedeiro, mas existem múltiplos estressores ambientais que causam disbiose intestinal nos  
712 peixes. Os peixes amostrados neste estudo estavam expostos a uma mistura de contaminantes  
713 ambientais provenientes dos esgotos urbanos e dos efluentes industriais. Sugerimos que os  
714 grupos microbianos que melhor representaram a cada riacho em nosso estudo seja usado  
715 como indicadores de qualidade ambiental em futuras pesquisas e monitoramento ambiental.  
716 Aqueles grupos microbianos serviram de sinais de aviso prévio da degradação ambiental  
717 antecipando assim possíveis danos em maior escala, tais como efeitos deletérios nas  
718 populações e comunidades biológicas.

719         Finalmente este estudo lança luz sobre uma perspectiva até então pouco considerada,  
720 ou seja, a ideia de utilizar a avaliação da microbiota intestinal dos peixes como um parâmetro  
721 para avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos. Até onde conhecemos  
722 poucos são os estudos que usam esta perspectiva em peixes selvagens. Muitas pesquisas são  
723 feitas nos laboratórios avaliam o efeito de contaminantes de forma isolada. Os peixes  
724 selvagens estão expostos a misturas de contaminantes antrópicos e a múltiplas condições  
725 ambientais que nos laboratórios é difícil de replicar. A avaliação dos efeitos da contaminação  
726 ambiental através das comunidades microbianas intestinais nos peixes é uma das principais  
727 inovações de nossa pesquisa.

728



## ANEXOS 1

## Autorização da CEUA para realização do estudo

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL  
 Universidade Federal do Rio Grande  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP  
 ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br



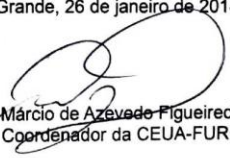
## CERTIFICADO Nº P003/2018

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da contaminação ambiental na estrutura e composição da microbiota de peixe guará", protocolo nº 23116.008972/2017-05, sob a responsabilidade de Juliano Zanette - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 24 de janeiro de 2018 (Ata 001/2018).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq030/2017
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Christian Deyvis Nolorbe Payahua
VIGÊNCIA DO PROJETO	08/03/2019
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	<i>Jenynsia multidentata</i> e <i>Phalloceros caudimaculatus</i>
NÚMERO DE ANIMAIS	<i>Jenynsia multidentata</i> – 120 <i>Phalloceros caudimaculatus</i> - 90
PESO/ IDADE	5 g / Adultos
SEXO	Machos
ORIGEM	Estuário da Lagoa dos Patos, RS
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Março de 2019

Rio Grande, 26 de janeiro de 2018.

  
 Med. Vet. Marcio de Azevedo Figueiredo  
 Coordenador da CEUA-FURG