

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

IVANA CORREIA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A ELASMOBRÂNQUIOS
DO LITORAL AMAZÔNICO BRASILEIRO

São Luís

2021

IVANA CORREIA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientanda

Ivana Correia Costa

Orientador

Dr. Jorge Luiz Silva Nunes

Co- orientadores

Dr. Salvatore Siciliano

Dra. Maria Raimunda Chagas Silva

São Luís

2021

Correia Costa, Ivana.

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A
ELASMOBRÂNQUIOS DO LITORAL AMAZÔNICO BRASILEIRO / Ivana
Correia Costa. - 2021.

87 p.

Coorientador(a): Salvatore Siciliano.

Orientador(a): Jorge Luiz Silva Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2021.

1. Bactéria. 2. Fungo. 3. Raia. 4. Segurança de
alimentos. 5. Tubarão. I. Siciliano, Salvatore. II.
Silva Nunes, Jorge Luiz. III. Título.

IVANA CORREIA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A ELASMOBRÂNQUIOS
DO LITORAL AMAZÔNICO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Luiz Silva Nunes (orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Salvatore Siciliano (Coorientador)
Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Maria Raimunda Chagas Silva (Coorientador)
Universidade CEUMA

1º Examinador Prof. Dra. Ivone Garros Rosa
Universidade Federal do Maranhão

2º Examinador Prof. Dr. Getúlio Rincon Filho
Universidade Federal do Maranhão

3º Examinador Dra. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo

Dedico a minha querida e amada mãe Maria Francisca Pires Correia, por seu apoio, amor e incentivo aos estudos. Ao meu querido e admirado pai Hilton Costa, por seu exemplo de bondade, ambos (in memoriam). As minhas irmãs, Maria, Ivanilce e em especial a Malena, companheira de muitos momentos bons.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir a conclusão de uma etapa importante na minha vida.

Aos meus pais Francisca Pires Correia e Hilton Costa (*in memoriam*), e irmãs, pelo incentivo aos estudos. Especialmente a minha irmã Malena Costa por sempre me apoiar e vibrar com cada pequena vitória minha.

Ao meu orientador Jorge Luiz Silva Nunes por ter aceitado me orientar, e por ter pensado em um projeto para desenvolvermos que contemplasse também a minha área de formação. Sou imensamente grata por isso!

Sou imensamente grata a professora Kátia Regina Assunção Borges, por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Obrigada por me auxiliar em parte da minha pesquisa.

Agradeço ao professor Salvatore Siciliano por permitir que parte da minha pesquisa fosse realizada em seu laboratório, e aproveitei o momento para agradecer também o Instituto Oswaldo Cruz, local de trabalho do professor em questão.

Agradeço às minhas amigas, Aline Nogueira e Daniele Pereira, pelo incentivo e conhecimento compartilhado que contribuíram grandemente para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas de turma de mestrado que durante esses dois anos de convivência compartilhamos nossas experiências e nos tornamos uma turma unida onde o apoio era mútuo.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

À UFMA, e à FAPEMA pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

Os homens semeiam na terra o que colherão na vida espiritual: os frutos da sua coragem ou da sua fraqueza!

Allan Kardec

RESUMO

Os elasmobrânquios constituem o grupo de vertebrados mais ameaçados do planeta. Embora a maioria dos estudos enfatizem este cenário em função da sobrepesca motivada pela exploração dos seus subprodutos, há vários tipos de impactos antrópicos que estão em evidência e são estudados por meio da aplicação de metodologias emergentes. Essas são baseadas nos enfoques sobre a conservação da biodiversidade e até mesmo da compreensão dos processos de contaminação, na descrição dos contaminantes e o suas implicações metabólicas. Apesar da insipiência de estudos que tem mostrado as alterações na configuração original dos habitats naturais pelos processos de urbanização, esta linha de investigação tem grande potencial de crescimento, pois podem variar desde os efeitos da supressão de manguezais, aterramentos, mudanças na dinâmica hídrica local até as consequências ocasionadas pela poluição provenientes de descarga de efluentes domésticos e industriais. No estado do Maranhão, precisamente na Ilha de São Luis, a dinâmica do processo de urbanização ao longo de quatro décadas tem mostrado uma notória transformação que se inicia com a implementação do distrito industrial, instalação de um amplo complexo portuário e com construção civil para a edificação centenas de milhares de imóveis. Desta forma, a presente Dissertação de Mestrado se preocupou em gerar um *Baseline* sobre a microbiota associada aos Elasmobrânquios do Litoral Amazônico Brasileiro, pois corresponde a um assunto com grande relevância global mediante a velocidade em que os ambientes estão se alterando e pelo fato de que os microrganismos apresentam um ciclo de vida curto, período geracional resultante da reprodução extremamente rápida e grande potencial de mutação, que podem ser usados como sentinelas no acompanhamento das mudanças ambientais. Para isso, foram desenvolvidos três estudos envolvendo uma revisão cientométrica e dois estudos inéditos que amostraram os elasmobrânquios no Golfão Maranhense. O primeiro capítulo constou de uma revisão de estudos científicos publicados nas últimas duas décadas sobre a associação da microbiota de Elasmobrânquios, geralmente compostas por bactérias e/ou fungos, que mostrou quão o assunto ainda é globalmente incipiente e pode se tornar muito preocupante face as mutações dos microrganismos quanto a resistência à alguns fármacos. O segundo capítulo realizou uma investigação quanto à composição bacteriana da microbiota entérica de tubarões e raias capturados no Golfão Maranhense, enquanto o terceiro capítulo descreveu a composição da microbiota fúngica de tubarões e raias comercializadas em supermercados ou mercados públicos da Ilha de São Luis enfatizando a preocupação com a segurança alimentar. Os resultados dessa Dissertação de Mestrado revelam que existe uma grande preocupação com a mudança ambiental, com aumento potencial da resistência dos micro-organismos e a preocupação com a combinação destes dois fatores na geração de complicações nos tratamentos no futuro, bem como a necessidade de maior controle higiênico-sanitário na cadeia produtiva dos recursos pesqueiros. Pois, a maioria das bactérias encontradas nos elasmobrânquios aqui estudados são registradas pela primeira vez e alguns gêneros de fungos identificados são produtores de micotoxinas e doenças à seres humanos.

Palavras-chave: Tubarão. Raia. Bactéria. Fungo. Segurança de alimentos.

ABSTRACT

Elasmobranchs constitute the most endangered vertebrate group around world, although most studies emphasize this scenario due to overfishing motivated by the exploitation of their by-products, there are several types of anthropogenic impacts that are in evidence and are studied through the application of methodologies emerging, approaches on biodiversity conservation to those dedicated to understanding the contamination processes in the description of contaminants and their metabolic implications. Despite the insipience of studies that have shown changes in the original configuration of natural habitats by urbanization processes, this line of research has great potential to growth, as they can vary from the effects of suppression of mangroves, landfills, changes in local water dynamics to the consequences caused by pollution from discharges of domestic and industrial effluents. In the state of Maranhão, precisely on the island of São Luis, the dynamics of the urbanization process over four decades has shown a notable transformation that begins with the implementation of the industrial district, installation of a large port complex and civil construction for the building hundreds of thousands of properties. Thus, this Master Science Thesis was concerned with generating a Baseline on the Elasmobranch-associated microbiota of the Brazilian Amazon Coast, as it corresponds to a subject with great global relevance due to the speed at which the environments are changing and the fact that the microorganisms have a short life cycle, generational period resulting from extremely fast reproduction and great mutation potential, which can be used as sentinels in environmental monitoring. For this, three studies were developed involving a scientometric review and two unpublished studies that sampled elasmobranchs in the Gulf of the Maranhão. The first chapter consisted of a review of scientific studies published in the last three decades on the Elasmobranch-associated microbiota, usually composed of bacteria and/or fungi, which showed how the subject is still globally incipient and can become very worrying due to mutations of microorganisms regarding resistance to some drugs. The second chapter conducted to investigation into the bacterial composition of the enteric microbiota of sharks and batoids captured in the Gulf of the Maranhão, while the third chapter described the composition of the fungal microbiota of sharks and batoids commercialized in supermarkets or public markets on the Maranhão Island, emphasizing the concern with food safety. The results of the Master Science Thesis reveal that there is great concern about environmental change, with increased potential resistance of microorganisms and concern about the combination of these two factors in the generation of complications in treatments in the future, as well as the need for greater hygienic control -sanitary in the productive chain of fisheries resources. Because most of the bacteria found in the elasmobranchs studied here are registered for the first time and some genera of fungi identified are producers of mycotoxins and diseases to human beings.

Keywords: Sharks. Batoids. Bacteria. Fungi. Safety food.

LISTA DE SIGLAS

APA	Água peptonada alcalina
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BPMA	Boas Práticas de Manipulação de Alimentos
CEs	Contaminantes Emergentes
CV	Costa & Vernin
CNB	Costa Norte do Brasil
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAM	Eosina azul de metileno
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LRNEB	Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UICN	União Internacional para a Conservação da Natureza
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Interação ecológica entre elasmobrânquios e microbiota associada	13
2.2 Produção e consumo de elasmobrânquios.....	14
2.3 Segurança alimentar.....	15
2.3.1 Microrganismos contaminantes	17
2.3.2 Fontes de contaminação	18
2.3.3 Resistência de microrganismos.....	19
3 OBJETIVO GERAL	20
3.1 Objetivos específicos.....	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO I	26
CAPÍTULO II.....	50
CAPÍTULO III	66
ANEXO- NORMAS DO PERIÓDICO PeerJ.....	81

1 APRESENTAÇÃO

Nos últimos anos muitos estudiosos têm se preocupado em compreender os mecanismos de contaminação em ambientes aquáticos e suas implicações à saúde humana (CARDOSO et al., 2012). As principais vias de contaminação e poluição de corpos d'água provém das próprias atividades humanas, que podem ter origem em diferentes setores de produção, a saber o setor primário têm apresentado enormes catástrofes ambientais no tocante das atividades de mineração (ANDRADES et al., 2020a; BITTARELLO et al., 2020), prospecção de combustíveis fósseis (DE OLIVEIRA et al., 2020) e agronegócios (NASRALA NETO, LACAZ e PIGNATI, 2014); o setor secundário por meio do refugo de atividades industriais que atingem ambientes aquáticos e lençóis freáticos devido à deficiência de sistemas de tratamento de rejeitos; por fim o setor terciário que por meio dos bens de serviço tem promovido alterações diretas na paisagem (ANDRADES et al., 2020b;) e nos ecossistemas (GONÇALVES et al., 2020).

Dentre os contaminantes globais e emergentes em pesquisas científicas podemos destacar a presença de hormônios e antibióticos em ambiente aquáticos provenientes de fármacos metabolizados por humanos e animais, somados a inoperância ou ausência dos serviços de saneamento básico (e.g. sistemas de tratamento de águas) e aos descartes realizados pelos domicílios e hospitais (LANDRIGAN et al., 2020). Assim, uma das maiores preocupações das mudanças ambientais causadas pela contaminação e poluição está voltada para o lançamento de substâncias com atividade mutagênicas que podem alterar geneticamente comunidades microbianas ao ponto de deixá-las altamente resistentes aos fármacos ou alterando suas relações ecológicas com os demais organismos aos quais estão associadas (NOGALES et al., 2011; CARDOSO et al., 2012).

A resistência bacteriana aos antibióticos encontrados em ambientes aquáticos pode provocar alterações ecológicas para um estado de patogenicidade, consistindo em um grande problema de saúde pública, coletiva e ambiental (CARDOSO et al., 2012; MARTÍNEZ, 2008). A resistência antimicrobiana é um fenômeno natural, causada por diversos fatores (e.g. inativação do antibiótico, modificação ou transmissão do alvo de atuação do antibiótico, seletividade da membrana) (TAVARES, 2002). Cepas bacterianas têm mostrado um aumento da resistência para a maioria dos fármacos usados para tratamento de doenças infecciosas, o que torna esse problema ainda mais perigoso para a saúde humana (WHO, 2020).

Portanto, os eventos sucessivos de manejo inadequado de efluentes domésticos e industriais além de contribuir para a contaminação dos ambientes aquáticos também têm impactado diretamente a comunidade microbiana, que por muitas vezes são associados aos

recursos pesqueiros (ABESSA et al., 2012). Os Elasmobrânquios (tubarões e raias) possuem naturalmente uma microbiota associada representada por bactérias e fungos (BANG et al., 2018). Contudo a composição dessa comunidade microbiana pode sofrer alteração em função da descarga de contaminantes e poluentes por meio dos tratamentos de efluentes ineficientes, a qual também contribui para o surgimento de micro-organismos resistentes (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; ROCHA; KLIGERMAN; OLIVEIRA, 2019). Desse modo, quando se consome alimentos contaminados por bactérias e fungos patogênicos pode-se adquirir sérias consequências na saúde, desde uma simples infecção intestinal ou até mesmo à morte do indivíduo.

Por outro lado, os trabalhos publicados sobre a microbiota associada a Elasmobrânquios ainda são escassos, pois o conhecimento sobre esse assunto é reduzido por se tratar de um assunto globalmente emergente. Normalmente os estudos existentes relatam a microbiota composta por algumas bactérias e fungos associados ao intestino, cavidade oral e pele de poucas espécies (TAO; BULLARD; ARIAS, 2014; UNGER et al., 2014; FERNANDO et al., 2015; DOANE et al., 2017; JUSTE-POINAPEN et al., 2019).

Diante do exposto, essa dissertação propõe realizar um *baseline* sobre a composição da microbiota (bactérias e fungos) associada às raias e aos tubarões do Litoral Amazônico Brasileiro. O estudo possui uma importância significativa tanto para compreender a relação ecológica existente entre hospedeiro e micro-organismo, quanto para avaliar a qualidade microbiológica da carne desses animais, visto que esses peixes são fonte de alimento e possuem uma alta taxa de consumo pela população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Interação ecológica entre Elasmobrânquios e microbiota associada

Os Elasmobrânquios estão em declínio mundial devido à intensa exploração humana. A maioria das espécies de grande porte foi reduzida a cerca de 10% de suas populações originais (GRAHAM; SPALDING; SHEPPARD, 2010) nos últimos 50 anos (PACOUREAU et al., 2021). Uma das causas desse declínio é a pesca predatória fomentada pelo comércio de barbatanas e carne, que tem gerado um impacto profundo na redução da população de várias espécies (DULVY et al., 2014; PACOUREAU et al., 2021). Diante disso, Elasmobrânquios são considerados o grupo de peixes marinhos mais ameaçado do mundo (DULVY et al., 2014; DAVIDSON; DULVY, 2017; PACOUREAU et al., 2021).

Existem outras ameaças à redução da população de Elasmobrânquios, trata-se da suscetibilidade a infecções bacterianas e/ou doenças transmissíveis, que nas últimas décadas tem sido alvo de vários estudos, os quais detectaram o aumento de infecções em vários organismos marinhos (POGOREUTZ et al., 2019). Apesar disso, poucos registros de casos de infecções em Elasmobrânquios na natureza estão documentados e disponíveis (DAGLEISH et al., 2010).

Os micro-organismos podem ser encontrados em todos os tipos de ambientes (*e.g.* edáfico, aquático, aéreo), bem como na superfície ou no interior de outros organismos (*e.g.* plantas, animais) (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012). Como os demais animais, os tubarões e raias são considerados animais hospedeiros de comunidade microbiana diversa associada, que normalmente é denominada de microbioma (BANG et al., 2018) e possui na sua composição a presença de bactérias, fungos e vírus (DOANE et al., 2017).

A abundância dos microrganismos que compõem a microbiota associada aos animais podem variar de acordo com o espaço e o tempo em resposta às relações ecológicas com o hospedeiro e condições ambientais. É natural que haja coevolução na relação entre hospedeiro-microbioma, porém, caso ocorra algum tipo de perturbação nesta relação é possível resultar na alteração no estado de saúde do hospedeiro (DOANE et al., 2017). Portanto, o ambiente em condições equilibradas permitem o equilíbrio na relação hospedeiro-microbioma, enquanto qualquer mudança ambiental (*e.g.* poluição, contaminação) podem beneficiar o surgimento e a proliferação de infecções (patogenias) (POGOREUTZ et al., 2019).

A microbiota associada aos tubarões é diversificada sendo composta por fungos e bactérias, isso ocorre devido à diversidade de espécies hospedeiras e da ampla exploração do habitat marinho associados às modificações antrópicas no ambiente (DOANE et al., 2017). A caracterização da composição da microbiota é fundamental para compreender o funcionamento

das relações ecológicas, principalmente em decorrência das alterações ambientais catalisadas por atividades antrópicas (GIVENS et al., 2015). A microbiota associada às raias apesar de pouco explorada pelos estudos também é bem diversificada, inclui vírus, bactérias e fungos (GARNER, 2013; EMAM et al., 2019).

As bactérias Gram negativas do gênero *Vibrio* spp., são encontradas naturalmente na água do mar (LOWRY; SMITH, 2007), são registradas como componente da microbiota associada aos elasmobrânquios e está relacionada com lesões em diversas partes do corpo destes organismos (*e.g.* canais cefálicos, sangue, cavidade oral, intestino, brânquias e pele) (CROW; BROCK; KAISER, 1995; MYLNICZENKO et al., 2007; UNGER et al., 2014; TAO; BULLARD; ARIAS, 2014; EMAM et al., 2019; JUSTE-POINAPEN et al., 2019).

Um estudo realizado em Fiji (Oceania) com tubarões da espécie *Sphyrna lewini*, por meio de ferramentas moleculares, evidenciou que a microbiota intestinal apresentava na sua composição bactérias pertencentes às famílias Enterobacteraceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Bradyrhizobiaceae, Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Staphylococcaceae e Streptococcaceae (JUSTE-POINAPEN et al., 2019), porém, parte dessas bactérias estão associadas a doenças presentes em elasmobrânquios (JUSTE-POINAPEN et al., 2019).

Os fungos assim como as bactérias também fazem parte do microbioma associado às raias e tubarões. O complexo de espécies *Fusarium solani* consiste no grupo de fungos mais prevalentes e virulentos em infecções em seres humanos e nos animais (FERNANDO et al., 2015). Apesar dos escassos relatos de casos que descrevem infecções fúngicas em Elasmobrânquios, há registros de vários tipos de lesões em tubarão martelo causadas por infecções de *Fusarium solani* (FERNANDO et al., 2015). Além disso, também já foi constatada a presença do fungo *Paecilomyces lilacinus* no tubarão-martelo (*Sphyrna mokarran*), enquanto *Exophiala pisciphila* e *Mucor circinelloides* foram detectados em um indivíduo juvenil de tubarão zebra (*Stegostoma fasciatum*) (MARANCIK et al., 2011).

2.2 Produção e consumo de Elasmobrânquios

A Itália é o país que menos produz e mais importa carne de Elasmobrânquios em toda a Europa, normalmente a comercialização ocorre como pescado e a sua importação média é estável (10.000 ton/ano), o que corresponde a um consumo de menos de 200g/ano/per capita, enquanto as nações europeias que mais exploram e exportam Elasmobrânquios são Espanha, França e Reino Unido (SERENA et al., 2010).

Nos Estados Unidos a carne dos Elasmobrânquios é destinada ao consumo interno, enquanto as barbatanas são exportadas. A carne de tubarão possui valor comercial insignificante, o preço é em torno de US \$ 1,0 por 0,5 kg, já a barbatana é extremamente valorizada no mercado estrangeiro e seu preço atinge cerca de vinte vezes o valor da carne (SERENA et al., 2010).

No Brasil, os tubarões e as raias são capturados como espécie-alvo ou como fauna acompanhante (*bycatch*) (ICMBIO, 2016). As estatísticas reais sobre as capturas de elasmobrânquios ao longo do tempo são deficientes por não apresentarem informações por espécie, quando os animais desembarcam nos portos chegam sem nadadeiras e sem cabeça, isso dificulta sua identificação morfológica o que agrava ainda mais o panorama da conservação dos recursos pesqueiros em águas nacionais (GEMAQUE et al, 2017; FEITOSA et al, 2018). No entanto, metade das capturas pesqueiras brasileiras são derivadas de operações artesanais (navios de pequeno e médio porte), que normalmente possuem equipamentos e técnicas práticas pouco sofisticadas de pesca predatória (BORNATOWSKI; BRAGA; BARRETO, 2018).

As pescarias destinadas aos Elasmobrânquios faturaram centenas de milhões de dólares desde 2000, com cerca de 759.495 toneladas desembarcadas em todo o mundo entre 2009 e 2013 (SIMPENDORFER; DULVY, 2017). O objetivo maior dessa exploração é a comercialização de barbatanas (FEITOSA et al., 2018). Nos últimos anos a demanda do mercado de barbatanas de tubarão tem mudando para o comércio de carne, no Brasil, duzentos mil toneladas de peixes cartilagosos foram desembarcadas entre 2000 e 2011 (BARRETO et al., 2017). O Brasil está entre os principais países pesqueiros de elasmobrânquios e possivelmente é o maior importador de carne de tubarão do mundo (BARRETO et al., 2017).

O Norte e Nordeste do Brasil lideram a captura de Elasmobrânquios no país, sendo que a Costa Norte do Brasil (CNB) abriga a maior floresta de manguezal contínua do mundo, sustentando uma importante área de pesca (FEITOSA et al., 2018). O estado do Maranhão comercializa um número expressivo de elasmobrânquios, principalmente na costa leste, região de Tutoia (Delta do rio Parnaíba) (FEITOSA et al., 2018; MARTINS et al., 2018), esse comercio possui grande importância para a economia local (MARTINS et al., 2018).

2.3 Segurança alimentar

O pescado sai do ambiente aquático com a microbiota associada naturalmente ao muco, brânquias e intestino (SANTIAGO et al., 2013). Caso não seja submetido imediatamente ao processo de conservação pelo frio para retardar o crescimento microbiano, esses microorganismos poderão contaminar o peixe como todo. A ação do gelo também funciona como

retardante das reações químicas e enzimáticas que começam a ocorrer no período *post-mortem* do animal (SANTIAGO et al., 2013).

O pescado é um alimento considerado altamente perecível devido à elevada atividade de água presente nos tecidos, ao teor de lipídeos insaturados, à ação destrutiva das enzimas e ao pH próximo da neutralidade, assim essas características combinadas à alta atividade metabólica do microbioma associado promovem a rápida deterioração do pescado (SOARES; GONÇALVES, 2012). A velocidade da decomposição do pescado também é catalisada por alguns fatores externos, como o processamento ou a distribuição de forma inadequada do pescado, que reduzem o seu tempo de consumo (FERREIRA et al., 2014).

Sendo assim, as boas práticas higiênico-sanitárias durante o processo de captura, armazenamento e comercialização do pescado contribuem diretamente para diminuição da contaminação por agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) e consequentemente na melhoria da sua qualidade (LUCINDO et al., 2016), portanto, a aplicação das Boas Práticas de Manipulação de Alimentos (BPMA) são fundamentais para prevenção e controle contaminação por agentes microbiológicos do pescado durante todas as etapas da cadeia produtiva (SANTIAGO et al., 2013; LUCINDO et al., 2016).

Dentre as principais legislações brasileiras que regulamentam a comercialização do pescado, destaca-se o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), atribuição federal que pode ser aplicada na ausência de legislação estadual e municipal. Além disso, existe a Resolução RDC nº 216, de atribuição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre técnicas e boas práticas para serviços de alimentação (BRASIL, 2017).

O RIISPOA estabelece que o pescado pode ser: fresco, resfriado e congelado. Entende-se por pescado fresco aquele que não passou por nem um processo de conservação, a não ser a ação do gelo, o pescado resfriado deve estar devidamente acondicionado em gelo e mantido em temperatura entre -0,5 a -2°C, e o pescado congelado é quando há o tratamento adequado de congelamento em temperatura não superior a -25°C (BRASIL, 2017).

Uma das diretrizes do RIISPOA é a lavagem prévia do pescado utilizado como matéria-prima para consumo humano direto ou para a industrialização de forma a promover a limpeza, a remoção de sujidades e microbiota superficial (BRASIL, 2017). Segundo o RIISPOA, o pescado proveniente da fonte produtora não pode ser destinado à venda direta ao consumidor sem que haja uma prévia fiscalização sob o ponto de vista industrial e sanitário (BRASIL, 2017).

Em relação aos atributos de frescor do peixe devem ser observadas algumas características, considerando a espécie analisada: a superfície do corpo deve apresentar um relativo brilho metálico e reflexos multicores próprios; olhos claros, brilhantes, luzentes, convexos, transparentes, ocupando toda a órbita ocular; brânquias róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com cheiro natural; abdômen firme, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos (BRASIL, 2017).

2.3.1 Microrganismos contaminantes

Bactérias como *Salmonella* spp. são consideradas indicadoras de qualidade alimentar, pois estão vinculadas diretamente às doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados (FARDSANEI et al., 2016). O gênero *Vibrio* também apresenta grande importância epidemiológica devido à sua associação com a intoxicação alimentar grave proveniente ao consumo de peixes e mariscos contaminados (ESPIÑEIRA et al., 2010). As estirpes de *Vibrio*, mais relevantes para a segurança alimentar são: *V. cholerae*, *V. vulnificus* e o *V. parahaemolyticus*, pois estão amplamente distribuídas nos organismos aquáticos marinhos e estuarinos (DE SOUSA et al., 2004; EVANGELISTA BARRETO et al., 2017). Além disso, *V. parahaemolyticus* é considerado a principal causa de gastroenterite humana em países asiáticos (ALABOUDI et al., 2016).

Os coliformes normalmente são usados como parâmetro para avaliar a qualidade de alimentos por agências de controle sanitário, pois estes microrganismos são patógenos capazes de provocar enfermidades em consumidores de pescados contaminados (EVANGELISTA BARRETO et al., 2017). Dentre os coliformes, a bactéria mais relevante como indicadora de qualidade alimentar é a *Escherichia coli*, pois a sua presença remete a contaminação de origem fecal. As estirpes que mais se associam a surtos alimentares são: *E. coli* O157: H7 (KAMEYAMA et al., 2015) e *Enterococcus faecalis* (YANG et al., 2015).

Os micro-organismos indicadores podem ser utilizados na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos por fornecerem informações sobre a ocorrência de contaminação por bactérias patogênicas ou deterioradoras, além de serem parâmetro das condições higiênico-sanitárias durante a produção, o processamento e/ou armazenamento dos alimentos (EVANGELISTA BARRETO et al., 2017). Desta forma, a identificação imediata e precisa desses agentes patogênicos é fundamental tanto para assegurar a qualidade do alimento quanto para traçar o perfil do patógeno bacteriano, pois em caso de infecção de humano pode direcionar ao tratamento mais adequado (LAW et al., 2015).

2.3.2 Fontes de contaminação

A produção de águas residuais aumentou consideravelmente em função do aumento da população humana, isso tem promovido o descarte de novos poluentes em corpos d'água naturais. Uma das fontes de descarga de poluentes e/ou agentes contaminantes são provenientes de produtos usados pelo agronegócio, podendo alcançar corpos hídricos naturais diretamente por meio da lixiviação causado por chuvas e/ou rios (VÉLEZ et al., 2019).

Muitos destes poluentes fazem parte dos “Contaminantes Emergentes” (CEs) que se destacam por sua diversidade e composição química complexa. Os produtos fármacos também tem sobressaído no atual panorama de contaminantes em corpos hídricos naturais, os hormônios e antibióticos estão entre as substâncias mais comumente identificadas em ambiente aquáticos. Uma das grandes preocupações sobre os CEs encontrados nas águas é que essas substâncias podem ser acumuladas em organismos aquáticos e atingir os seres humanos por meio do consumo (VÉLEZ et al., 2019). Além do mais, os fármacos não são removidos pelos tratamentos de água convencionais devido as suas propriedades químicas são persistentes, tornam essas substâncias muito perigosas porque possuem um alto potencial para bioacumulação nos organismos aquáticos e baixa biodegradabilidade (CRESTANA; DA SILVA, 2011).

Os sistemas de esgoto urbanos são projetados para evacuar resíduos humanos das casas para áreas de baixa exposição humana e gradualmente reintegrá-los em cursos de água naturais (e.g. mar, rios). Esse ciclo é fundamental para a saúde pública, pois as águas residuais podem ser um potencial disseminador de bactérias patogênicas e/ou potencializador da resistência à fármacos usados contra infecções em função do constante *input* de antibióticos em ambientes aquáticos (ROBINSON et al., 2016; FRESIA et al., 2019)

A contaminação ambiental atinge as comunidades microbianas alterando suas relações ecológicas, tais como a sua composição e a abundância das espécies (CARDOSO et al., 2012). Comunidades microbianas alteradas em ambientes marinhos podem atingir os seres humanos e lhes causar grandes transtornos devido à dificuldade de tratamento médico aos microrganismos resistentes aos antibióticos (NOGALES et al., 2011).

Estudos realizados em ambientes aquáticos que abordaram a resistência frente aos antimicrobianos mostram o aumento dessa problemática, pois tem havido um expressivo crescimento na resistência de microrganismos. Os trabalhos sugerem que essa resistência foi

desenvolvida pela presença de antibióticos no meio aquático provenientes do descarte de efluentes domésticos, hospitalares e industriais não tratados (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; ROCHA; KLIGERMAN; OLIVEIRA, 2019).

2.3.3 Resistência de microrganismos

Os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de doenças causadas por bactérias. Essas drogas são substâncias naturais ou sintéticas com capacidade bactericida ou de retardar seu crescimento. No entanto, a eficácia dos tratamentos baseados na terapia antibiótica foi reduzida ao longo do tempo, como resultado da disseminação de bactérias resistentes a esse tipo de fármaco (ANDERSSON; LEVIN, 1999; COUTINHO et al., 2014). Quando os antibióticos são responsáveis pelo surgimento de mutações na resistência, estas características tendem a se espalhar rapidamente entre as populações bacterianas (ZHANG et al., 2011).

O aumento de infecções bacterianas associadas aos problemas de resistência aos antibióticos tornou-se uma grande ameaça à saúde pública mundial (GRARE et al., 2007; PONTES et al., 2018). O crescimento dessas infecções se deve justamente à resistência dos micro-organismos, que persistem mesmo após o tratamento com antibióticos (GRANT; HUNG, 2013). Essas infecções possuem alta taxa de morbidade e mortalidade se comparada com outras doenças (*e.g.* câncer de próstata e câncer de mama) (PONTES et al., 2018).

A resistência microbiana não se resume apenas às bactérias, outros micro-organismos como vírus, parasitas e fungos também adquiriram resistências ao longo dos anos (CARLET et al., 2011). O rápido surgimento de fungos patogênicos multirresistentes representa uma ameaça considerável ao controle de algumas doenças, pois esses micro-organismos respondem habilmente à seleção natural induzida pelo homem por meio de tratamentos com antifúngicos (FISHER et al., 2012; FISHER et al., 2018).

Em humanos, tratamento profilático à longo prazo em pacientes de risco pode levar ao surgimento de resistência antifúngica (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017), pois os fungos também possuem genes altamente mutáveis e se reproduzem rapidamente (FISHER et al., 2018). Os fungos que infectam humanos saudáveis dedicam grande parte de sua fisiologia para escapar ou resistir ao sistema imunológico do hospedeiro, suas estratégias às vezes diferem até mesmo entre linhagens de uma única espécie (KÖHLER et al., 2017).

As infecções fúngicas têm sido muito negligenciadas em relação a outras classes de doenças infecciosas, apesar de sua onipresença (FISHER et al., 2018). A interferência de fungos na saúde humana está cada vez mais evidente, e a taxa global de mortalidade por doenças

fúngicas agora excede a da malária ou câncer de mama e é comparável à da tuberculose e HIV (BROWN et al., 2012; FISHER et al., 2018).

3 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a microbiota associada aos elasmobrânquios (tubarões e raias) do Litoral Amazônico Brasileiro.

3.1 Objetivos específicos

- Realizar uma avaliação cienciométrica de estudos relatando microbiomas associados a elasmobrânquios;
- Fornecer um baseline das espécies de bactérias entéricas de raias e tubarões com diferentes modos de vida presentes no litoral amazônico brasileiro;
- Descrever a microbiota fúngica em amostras de tubarões e raias comercializados em São Luís- MA.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. DE S. et al. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643–661, 2012.
- ALABOUDI, A. R. et al. Detection, Identification, and Prevalence of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Fish and Coastal Environment in Jordan. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 1, p. M130–M134, 2016.
- ANDERSSON, D. I.; LEVIN, B. R. The biological cost of antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 489–493, 1999.
- ANDRADES, R. et al. Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the world's largest mining dam disasters. **Marine Pollution Bulletin**, 154, 2020.
- ANDRADES, R. et al. Anthropogenic litter on Brazilian beaches: Baseline, trends and recommendations for future approaches. **Marine Pollution Bulletin**, 151, 2020.
- BANG, C. et al. Metaorganisms in extreme environments: do microbes play a role in organismal adaptation? **Zoology**, v. 127, p. 1–19, 2018.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.
- BARRETO, R. R. et al. Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil. **Marine Policy**, v. 85, n. August, p. 114–122, 2017.
- BITTARELLO, A. C. et al. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: possible identification of mercury contamination biomarkers. **Science of the Total Environment**, 2020
- BORNATOWSKI, H.; BRAGA, R. R.; BARRETO, R. P. Elasmobranchs Consumption in Brazil: Impacts and Consequences. In: ROSSI-SANTOS, M. R.; FINKL, C. W. (Eds.). . **Advances in Marine Vertebrate Research in Latin America**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018. p. 251–262.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, Distrito Federal, 29 mar. 2017. Seção 1, p. 3, 2017. Disponível em:< https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698>. Acesso em: 25 nov. 2020
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.
- CARDOSO, A. M. et al. Metagenomics in Polluted Aquatic Environments. In: BALKINS, N. (Ed.). . **Water Pollution**. [s.l.] Intech, 2012. p. 90–104.
- CARLET, J. et al. Society's failure to protect a precious resource: Antibiotics. **The Lancet**, v. 378, n. 9788, p. 369–371, 2011.

- CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43–47, 2012.
- COUTINHO, F. H. et al. Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 441–452, 2014.
- CRESTANA, G. B.; DA SILVA, J. H. Fármacos Residuais : Panorama De Um Cenário Negligenciado. **Revista Internacional de Direito e Cidadania**, v. 9, p. 55–65, 2011.
- CROW, G. L.; BROCK, J. A.; KAISER, S. Fusarium solani fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. **Journal of wildlife diseases**, v. 31, n. 4, p. 562–565, 1995.
- DAGLEISH, M. P. et al. The First Report of Disease in a Basking Shark (*Cetorhinus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 4, p. 284–288, 2010.
- DAVIDSON, L. N. K.; DULVY, N. K. Global marine protected areas to prevent extinctions. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 1–6, 2017.
- DE OLIVEIRA. et al. Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, 160, 2020.
- DE SOUSA, O. V. et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 46, n. 2, p. 59–62, 2004.
- DOANE, M. P. et al. The skin microbiome of the common thresher shark (*Alopias vulpinus*) has low taxonomic and gene function β -diversity. **Environmental Microbiology Reports**, v. 9, n. 4, p. 357–373, 2017.
- DULVY, N.K. et al. Extinction Risk and Conservation of the World's Sharks and Rays. **Elife**, v. 3, n. 00590, p.1-34, 2014.
- EMAM, A. M. et al. An outbreak of *Vibrio alginolyticus* infection in aquarium-maintained dark-spotted (*Himantura uarnak*) and Tahitian (*H. fai*) stingrays. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 153–158, 2019.
- ESPIÑEIRA, M. et al. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 122–131, 2010.
- EVANGELISTA BARRETO, N. et al. Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 60-74–74, 2017.
- FARDSANEI, F. et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, v. 14, p. 24–30, 2016.
- FEITOSA, L. M. et al. DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

- FERNANDO, N. et al. Fatal *Fusarium solani* species complex infections in elasmobranchs: The first case report for black spotted stingray (*Taeniura melanopsila*) and a literature review. **Mycoses**, v. 58, n. 7, p. 422–431, 2015.
- FERREIRA, E. M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 49–54, 2014.
- FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.
- FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.
- FRESIA, P. et al. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. **Microbiome**, v. 7, n. 35, p. 1–9, 2019.
- GARNER, M. M. A Retrospective Study of Disease in Elasmobranchs. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 3, p. 377–389, 2013.
- GEMAQUE, R. et al. Why implement measures to conserve the diversity of Elasmobranchs? The case of the northern coast of Brazil. **Revista da Biologia**, v.17, n. 2, p. 1–7, 2017.
- GIVENS, C. E. et al. Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. **Marine Ecology Progress Series**, v. 518, p. 209–223, 2015.
- GONÇALVES, M. et al. Are the tidal flooded forests sinks for litter in the Amazonian estuary?, **Marine Pollution Bulletin**, v.161, 2020.
- GRAHAM, N. A. J.; SPALDING, M. D.; SHEPPARD, C. R. C. Reef shark declines in remote atolls highlight the need for multi-faceted conservation action. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 20, n. 5, p. 543–548, 2010.
- GRANT, S. S.; HUNG, D. T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 273–283, 2013.
- GRARE, M. et al. In vitro activity of para -guanidinoethylcalix [4] arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. n. July, p. 575–581, 2007.
- ICMBIO. INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção**. 2016. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-pan/pan-tubaroes/1-ciclo/pan-tubaroes-sumario.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2021.
- JUSTE-POINAPEN, N. M. S. et al. Community profiling of the intestinal microbial community of juvenile Hammerhead Sharks (*Sphyrna lewini*) from the Rewa Delta, Fiji. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- KAMEYAMA, M. et al. Distribution of is629 and stx genotypes among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 isolates in Yamaguchi Prefecture, Japan, 2004–2013. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 11, p. 1437–1441, 2015.
- KÖHLER, J. R. et al. Fungi that Infect Humans. **The Fungal Kingdom**, p. 811–843, 2017.

- LANDRIGAN, P. J. et al. Human Health and Ocean Pollution. **Annals of Global Health**, v. 86, n. 1, p. 1–64, 2020.
- LAW, J. W. F. et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 770, p. 1–20, 2015.
- LOWRY, T.; SMITH, S. A. Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 6, p. 876–880, 2007.
- LUCINDO, M. B. et al. Qualidade microbiológica da pescada branca Artigo. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 2, p. 199–210, 2016.
- MARANCIK, D. P. et al. Disseminated fungal infection in two species of captive sharks. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 686–693, 2011.
- MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365–367, 2008.
- MARTINS, A. P. B. et al. Analysis of the supply chain and conservation status of sharks (Elasmobranchii: Superorder Selachimorpha) based on fisher knowledge. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, 2018.
- MYLNICZENKO, N. D. et al. Blood culture results from healthy captive and free-ranging elasmobranchs. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, n. 3, p. 159–167, 2007.
- NASRALA NETO, E.; LACAZ, F. A. DE C.; PIGNATI, W. A. Vigilância em saúde e agronegócio: os impactos dos agrotóxicos na saúde e no ambiente. Perigo à vista!. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4709-4718, 2014
- NIENCHESKI, L. F. H. Recursos vivos do mar e poluição. **R.Cej**, n. 12, p. 58–62, 2000.
- NOGALES, B. et al. Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 2, p. 275–298, 2011.
- PACOUREAU, N. et al. Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. **Nature**, v. 589, p. 567-587, 2021.
- POGOREUTZ, C. et al. Similar bacterial communities on healthy and injured skin of black tip reef sharks. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1–16, 2019.
- PONTES, D. S. et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 42–74, 2018.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 753–775, 2017.
- ROBINSON, T. P. et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 377–380, 2016.
- ROCHA, A. C. DE L.; KLIGERMAN, D. C.; OLIVEIRA, J. L. DA M. Panorama da pesquisa sobre tratamento e reúso de efluentes da indústria de antibióticos. **Saúde em Debate**, v. 43, n. spe3, p. 165–180, 2019.

SANTIAGO, J. DE A. S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados - revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92–103, 2013.

SERENA, F. et al. **Background information about the shark fisheries**.2010.

SIMPFENDORFER, C. A.; DULVY, N. K. Bright spots of sustainable shark fishing. **Current Biology**, v. 27, n. 3, p. R97–R98, 2017.

SOARES, K. M. DE P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

TAO, Z.; BULLARD, S. A.; ARIAS, C. R. Diversity of bacteria cultured from the blood of lesser electric rays caught in the northern gulf of Mexico. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 26, n. 4, p. 225–232, 2014.

TAVARES, W. “Problem gram-positive bacteria: Resistance in staphylococci, enterococci and pneumococci to antimicrobial drugs”. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 409, 2002.

UNGER, N. R. et al. Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated within the oral flora of Florida blacktip sharks: Guidance for empiric antibiotic therapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

VÉLEZ, V. P. P. et al. Emerging Contaminants in Trans-American Waters. **Revista Ambiente e Agua**, v. 14, n. 6, p. 24–36, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resistência antimicrobiana**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

YANG, J. X. et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, n. May, p. 253–260, 2015.

ZHANG, Q. et al. Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. **Science**, v. 333, n. 6050, p. 1764–1767, 2011.

CAPÍTULO I

Artigo submetido no periódico **PeerJ**

1 **Elasmobranch-associated microbiota: a scientometric** 2 **literature review**

3 Ivana Correia Costa¹, Mariene Amorim de Oliveira², Rachel Ann Hauser-Davis³, Salvatore
4 Siciliano⁴, Jorge Luiz Silva Nunes¹

5 ¹ Laboratório de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
6 Maranhão/Brazil

7 ² Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Maranhão, São
8 Luís, Maranhão/Brazil

9 ³ Laboratório de Avaliação e Promoção a Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Oswaldo
10 Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

11 ⁴ Laboratório de Biodiversidade, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

12 Corresponding author

13 Ivana Costa¹, Travessa Terezinha de Sousa, nº24, Residencial João Alberto, São Luís,
14 Maranhão, 65047858, Brazil.

15 Email address: ivanacorreia72@gmail.com

16 **Abstract**

17 Elasmobranchs provide greatly relevant ecosystem services for the balance of the environments
18 in which they are inserted. In recent decades, sharp population declines have been reported for
19 many species in different regions worldwide, making this taxonomic group currently one of the
20 most threatened with extinction. This scenario is almost entirely due to excessive fishing
21 pressure, but any contributing factor that may cause additional mortality to populations must
22 be mapped and monitored. In a fast-changing world, emerging marine pollution associated with
23 climate change display the potential to increase the spread of infectious agents. These can, in
24 turn, lead to mortality events, both directly and indirectly, by reducing immune responses and
25 the physical and nutritional condition of affected individuals. In this context, the present study
26 aimed to analyze data concerning elasmobranch-associated microbiota, identifying study trends
27 and knowledge gaps in order to direct future studies on this topic of growing relevance for the
28 health of wild populations, as well as individuals maintained in captivity, considering the
29 zoonotic potential of these microorganisms.

30 **Keywords:** Bacteria, Fungi, Sharks and Batoids.

31

32

33

34 **Introduction**

35 Many elasmobranch (shark and ray) species have suffered global population declines in
36 recent years, with overfishing identified as the main factor (Pacoureaux et al., 2021). Other
37 elements, however, like different environmental stresses, also act as catalysts towards the
38 diversity crisis currently observed for this taxonomic group, including habitat degradation,
39 pollution, and the effects of climate change, such as rising ocean temperatures, acidification,
40 and eutrophication (Sehna et al., 2021). These can, in turn, alter vertebrate-associated
41 microbiota interactions and lead to structural and functional changes across entire microbiome
42 communities, ultimately affecting host health, increased infectious disease (Egan & Gardiner,
43 2016; Nakatsuji et al., 2017) and decreasing the welfare of many aquatic species, including
44 elasmobranchs (Ward & Lafferty, 2004; Pogoreutz et al., 2019).

45 Marine pollution is most severe along coastlines and in bays, ports and estuaries, due to
46 high wastewater, industrial, agricultural runoff and riverine pollution discharges (Landrigan et
47 al., 2020). Increased ocean pollution, in turn, leads to greater abundance and expansion of the
48 geographical extent of both naturally occurring and human-introduced marine and estuarine
49 pathogens, such as bacteria, toxin-producing algae, viruses, fungi and protozoa (Escobar et al.,
50 2015; Landrigan et al., 2020), while also favoring antibiotic resistance (Nogales et al, 2011).
51 Resistance traits in fact tend to spread quickly among microorganism populations, making
52 infections more difficult to treat (Zhang et al, 2011), comprising another contributing factor to
53 decreasing wildlife populations (Nogales et al, 2011).

54 Diverse microbial communities, usually formed by bacteria, fungi and viruses (Doane
55 et al., 2017), have been reported in association to elasmobranchs (Bang et al., 2018; Perry et
56 al., 2021). These microbiome components exhibit varied abundances over space and time in
57 response to both ecological host relationships and environmental restrictions (Pogoreutz et al.,
58 2019; Perry et al., 2021). Positive ecological host-microbiome relationships naturally co-
59 evolve, and associated microbiomes can, for example, facilitate nutrient absorption, regulate
60 host metabolism and act against pathogen invasion (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018;
61 Wilkins et al., 2019; Perry et al., 2021). However, negative aspects may also emerge, resulting
62 in compromised host health (Doane et al., 2017), as altered host-microbiome associations may
63 benefit the emergence of bacterial and fungal diseases (Pogoreutz et al., 2019).

64 Elasmobranch-associated microorganisms can cover the host epidermis or occupy
65 enteric cavities and/or microvilli (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018; Perry et al., 2021).
66 Autochthonous microbiota have been, for example, associated to different anatomical body

67 areas in sharks and rays, such as the oropharyngeal cavity, integument (Unger et al., 2014;
68 Florio et al., 2016) and several visceral organs (*i.e.*, intestine, liver, spleen, kidney, heart and
69 pancreas) (Marancik et al., 2011; Camus et al., 2013; Camus et al., 2016). Studies concerning
70 infectious diseases in elasmobranchs, however, are not widespread and usually concern
71 pathologies caused by bacteria and fungi only. For example, *Vibrio* sp. bacteria are often
72 reported for both sharks and rays (Crow, Brock & Kaiser, 1995; Mylniczenko et al., 2007; Tao,
73 Bullard & Arias, 2014), while the fungus *Fusarium solani* has been pointed out as the highest
74 cause of systemic mycosis in this taxonomic group (Crow, Brock & Kaiser, 1995; Fernando et
75 al., 2015; Desoubeaux et al., 2018). In this regard, the ecological roles (mandatory pathogen,
76 opportunistic pathogen, benign commensals, symbionts) of many elasmobranch-associated
77 microorganisms are still unknown and further microbiota composition assessments are
78 paramount (Mylniczenko et al., 2007; Tao, Bullard & Arias, 2014), becoming even more vital
79 in the face of environmental changes and elasmobranch host vulnerability (Givens et al., 2015;
80 Doane et al., 2017; Ritchie et al., 2017). In this context, the present study aims to carry out a
81 scientometric assessment of studies reporting elasmobranch-associated microbiomes serving as
82 a database for future investigations.

83 **Survey methodology**

84
85 This study comprises an integrative scientometric review following bibliographic
86 searches focusing on negative host interactions in elasmobranchs at the Scopus (Elsevier),
87 Google Scholar (Google) and Pubmed databases. Studies performed on any elasmobranch
88 species, both in captivity and under free-living conditions, were considered.

89 The keywords comprised “elasmobranchii”, “shark”, “ray”, “microbiome”, “bacteria”
90 and “fungi”, performed by crossing these descriptors using the Boolean operators “OR” and
91 “AND”. Inclusion criteria considered only white literature (articles and scientific notes)
92 published between 1990 and 2021, in both Portuguese and English. Exclusion criteria consisted
93 in gray literature (monographs, dissertations, theses, books, chapters, studies published in event
94 proceedings) and review articles, as well as articles addressing elasmobranch viruses and
95 protozoa.

96 **Results**

97 A total of 54 publications on elasmobranch-associated microbiota studies were found,
98 corresponding to 38 white literature titles, 31 scientific articles on bacterial microbiota, 6
99 exclusively addressing fungi as associated microbiota and only one addressing both bacteria
100 and fungi as microbiota components. The search results are presented in Tables 1 and 2,

101 alongside data on each investigated microbiota taxa, elasmobranch host species, sampled host
102 body region and authors.

103 Concerning bacteria, most studies in sharks were carried out in natural environments,
104 representing more than twice the number of studies carried out in captive elasmobranchs from
105 aquaria/oceanaria. The *Corynebacterium* taxon was reported in six shark species, followed by
106 *Haemophilus* sp., *Vibrio* sp, *Kordia* sp., *Salmonella enterica* and *Staphylococcus epidermidis*
107 present in five of the investigated species (Figure 1). Studies concerning bacteria in rays, on the
108 other hand, focused on captive specimens from aquaria/oceanaria. The ray species presenting
109 the highest microbiota richness rates comprised the Spiny butterfly ray *Gymnura altavela*, the
110 Groovebelly stingray *Dasyatis hypostigma*, and the Caribbean numbfish *Narcine bancroftii*,
111 and the microbiota taxa *Oceanimonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium chelonae* and
112 *Staphylococcus epidermidis* were present in more than one ray species (Figure 2).

113 Considering fungi as microbiota components, most studies were conducted on captive
114 sharks from aquaria/oceanaria, while studies with rays as hosts comprised one assessment for
115 species from natural environments and aquaria/oceanaria. Coincidentally, most of the studied
116 shark species were hammerheads, namely the Scalloped hammerhead *Sphyrna lewini*, the
117 Smalleye hammerhead *S. tudes* and the Great hammerhead *S. mokarran*, associated with three
118 different fungi species each. The fungus *Fusarium solani* was the most frequent in the analyzed
119 assessments (Figure 3).

120 Most studies focusing on the elasmobranch-associated microbiota in both natural
121 environments and aquaria were carried out in the United States, comprising 10 scientific articles
122 on free-living specimens and 11 on captive animals, followed by Brazil, India and China with
123 two articles each, all in free-living elasmobranchs from natural environments (Figure 4).

124 The low number of studies on elasmobranch-associated microbiota in the last 30 years
125 indicates a significant knowledge gap, mainly between 90's and 2007. From 2010, an increasing
126 interest in the subject is noted, increasing 9-fold in 2021 (Figure 5).

127 **Discussion**

128 Studies on elasmobranch-associated microbiota are scarce when compared to other
129 types of shark and ray assessments. Shark evaluations are more plentiful for animals from
130 natural environments, while studies concerning rays are more frequent for individuals from
131 aquaria/oceanaria.

132 Fungi belonging to the *Fusarium solani* species complex (FSSC) are the most prevalent
133 and virulent concerning infections in both humans and animals (Fernando et al., 2015).

134 However, *Fusarium* transmission is still not well understood, especially in aquatic
135 environments, emphasizing the need for further assessments concerning infection by species
136 belonging this genus (Desoubeaux et al., 2018). In this regard, one study isolated *Fusarium*
137 *solani* from the cephalic canal exudate of two of five *S. lewini* sharks living in an aquarium,
138 comprising the first report of *Fusarium solani* infection in the lateral line canal system and the
139 third for hammerhead sharks (Crow, Brock & Kaiser, 1995). Lesions were initially observed in
140 the cephalic canals, but extended during months up the lateral canal, leading to granulomatous
141 exudative mycotic dermatitis and resulting in chronic physical and behavioral deterioration,
142 until the specimens required sacrificing. Other studies indicate that the *Fusarium* genus is
143 associated to significant infections in elasmobranchs, with *F. solani* responsible for skin lesions
144 characterized by ulcers and hemorrhage of the frontal pectoral fin of a Blotched fantail ray
145 *Taeniurops meyeri* (also known as *Taeniura melanopsila* a junior synonym), and also capable
146 of causing white and purulent exudates in the cephalic canals and lateral line, resulting in animal
147 death (Fernando et al., 2015). In another assessment, a severe fungal infection also caused by
148 *F. solani* was observed in the cephalic canals and the lateral line system of seven Scalloped
149 hammerhead sharks (*S. lewini*) in an aquarium in Thailand, leading to extensive and severe
150 necrotizing cellulitis and resulting in animal death (Pirarat et al., 2016).

151 Other fungi genera have also been reported as infectious agents in elasmobranchs,
152 including a new species belonging to the microsporidiae group, responsible for infecting 30
153 Common stingrays *Dasyatis pastinaca*, invading the disc muscles and producing thin and
154 spindle-shaped subcutaneous swellings that developed into massive, elongated, tumor-like
155 lumps, comprising the first record of microsporidium infection in a batoid (Diamant et al.,
156 2010). Two records of progressive systemic mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*, *Mucor*
157 *circinelloides* and *Exophiala pisciphila* are also available for two captive shark species, the
158 Great hammerhead and the Zebra shark *Stegostoma fasciatum*, resulting in terminal disease
159 (Marancik et al., 2011).

160 In another study, a female Swell shark *Cephaloscyllium ventriosum* raised in captivity
161 began exhibiting abnormal behavior (swimming in circles and rolling repeatedly), and a
162 macroscopic necropsy and histopathological examination verified cartilage matrix ossification
163 and fibrosis in the skull and cervical vertebrae. The lesions were associated to a deep invasion
164 of the fungus *Exophiala* sp. (Erlacher-Reid et al., 2016), reinforcing the need to include fungal
165 infections as well as skeletal structure mineralization as a differential diagnosis when evaluating
166 elasmobranchs exhibiting abnormal swimming behaviors.

167 Bacteria are also responsible for infections in elasmobranchs. One study, for example,
168 reported the development of a large abscess on the dorsal surface of the calvarium and swollen
169 soft tissue around the left spiracle of an adult Yellow stingray *Urobatis jamaicensis* raised in
170 captivity, identified as associated to mycobacteria. A significant amount of fluid exudate was
171 drained from the site, the specimen was sacrificed and disseminated mycobacteriosis was later
172 confirmed (Clarke et al., 2013). Another case of splenic mycobacteriosis was observed in a
173 Freckled guitarfish specimen *Pseudobatos lentiginosus*) raised in captivity, where darkened
174 pigments appeared on the back skin and rostrum erythema, in addition to numerous whitish
175 granulomas of variable size dispersed throughout the splenic parenchyma. The animal died after
176 being transferred to a holding tank (Anderson et al., 2012). Two more cases of mycobacterial
177 infection in the same species, also from aquaria are noted, with *Micobacterium chelonae*
178 identified as the responsible agent following histological tissue and blood culture assessments,
179 confirmed by a DNA sequencing analysis after individuals were found dead inside their display
180 tanks (Tuxbury et al., 2017). The authors report that both acute and chronic mycobacteriosis
181 manifestations may occur in this elasmobranch species. An Epaulette shark *Hemiscyllium*
182 *ocellatum* specimen raised in captivity also presented granulomas caused by mycobacteria. The
183 specimen stopped feeding and was euthanized (Janse & Kik, 2012). Despite limited sampling,
184 it seems that elasmobranchs maintained in aquariums become susceptible to mycobacterial
185 infections, with a high pathogenic potential noted for this microorganism.

186 Concerning other infectious microorganisms, one assessment reported meningitis
187 and/or meningoencephalitis with inflammatory infiltrates observed in specific brain areas in
188 stranded juvenile Salmon sharks *Lamna ditropis* (Schaffer et al., 2012), comprising the first
189 report of *Carnobacterium* infection in sharks. The authors emphasize that brain infections
190 caused by this bacterium are a significant cause of morbidity and mortality in juvenile Salmon
191 sharks found stranded along the Pacific coast, specifically in California. In another report, the
192 bacteria *T. maritimum* was isolated for the first time in an adult Sand tiger shark *Carcharias*
193 *taurus* raised in captivity. The specimen presented skin lesions characterized by the presence
194 of abundant whitish necrotic tissue between the second dorsal fin and the precaudal fossa. After
195 being treated with medication, the specimen fully recovered from the infection (Florio et al.,
196 2016), suggesting that the skin may be a bacteria gateway in sharks. Identified as atypical, a
197 new *Brucella* strain was isolated in another assessment from the gills of a Bluespotted lagoon
198 ray *Taeniura lymma* raised in captivity that died suddenly during quarantine (Eisenberg et al.,
199 2017). According to the authors, this is the first report of a natural infection by this
200 microorganism in saltwater fish, increasing the host range of this pathogenic genus. Finally, the

201 first reported case of edwardsiellosis in elasmobranchs (the Blotched fantail ray) was reported
202 for *Edwardsiella piscicida*, where multiple large lesions were noted in the subepicardium and
203 compact myocardium, partially filled with cellular debris and degenerated granulocytes,
204 delimited by variable mixtures of hemorrhage, dispersed lymphocytes and mucin (Camus et al.,
205 (2016). According to the authors, much of the knowledge about disease processes in
206 elasmobranchs comes from diagnostic studies carried out in public aquaria. However, although
207 reports of bacterial diseases are limited, this is more likely due to insufficient reporting and
208 diagnostic investigation than to a lack of existing bacterial infections.

209 Concerning the intestinal elasmobranch microbiome, *P. damsela* and *C. koseri* have
210 been confirmed in all tested sharks (Juste-Poinapen, et al., 2019), while the characterization of
211 the intestinal microbiome of a free-living Black dogfish *Centroscyllium fabricii* through a feces
212 analysis revealed a wide variety of bacterial genera. Furthermore, in this case, about 25% of the
213 animal's gut microbiome was unable to be taxonomically classified at the phylum level,
214 suggesting a high microbial diversity not yet characterized in this microbiome (Johny et al.,
215 2018). In another assessment, the gut microbiota of juvenile Scalloped hammerheads from the
216 Rewa Delta (Republic of Fiji) contained a diverse bacterial community, including members
217 belonging to the Enterobacteraceae, Vibrionaceae, Propionibacteriaceae, Aeromonadaceae,
218 Staphylococcaceae, Streptococcaceae families, which are known as intestinal inhabitants of
219 terrestrial and marine vertebrate species, including humans and many of these microorganisms
220 are considered opportunistic pathogens (Juste-Poinapen et al., 2019). The authors indicate that
221 sewage spillage during the sampling period may be responsible for the presence of some known
222 indicator microorganisms, while dominance variations between bacterial species over time may
223 reflect environmental changes, such as temperature or food and water quality variations.

224 Regarding the elasmobranch skin microbiome, a microbiological analysis of the
225 epidermal mucus and skin of three elasmobranch species, the Atlantic nurse shark
226 (*Ginglymostoma cirratum*), the Lemon shark (*Negaprion brevirostris*) and the Southern
227 stingray (*Hypanus americanus*) identified a variety of bacterial orders, with the predominance
228 of Actinomycetales (Caballero et al., 2020). Another investigation concerning the skin
229 microbiota of three sharks and a ray also reported a variety of bacterial classes, although with
230 the predominance of Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria (Doane et al., 2020).

231 The microbiome is a product of both the host and the environment it inhabits and can
232 be affected by environmental variables. Thus, an equilibrium must be achieved between host
233 immune responses and microbial interactions to maintain elasmobranch microbiota community
234 consistency (Doane et al., 2017). For example, Gonçalves and Silva et al. (2020), observed that

235 *G. altavela* individuals living in natural environments contained specific bacteria and postulated
236 positive health effects due to this microorganism/host interaction. Temperature appears to be
237 the environmental variable most related to the proliferation of infectious agents in marine
238 animals, and abrupt water temperature alterations are a significant source of mortality
239 associated with infections in stranded sharks (Nastcha Wosnick, unpublished data). In a climate
240 change scenario, this is of particular concern, as an increase in potentially lethal infectious
241 diseases is expected, as well as pathogens associated with sublethal outcomes, such as reduced
242 immune response, physical condition, and fitness which, in turn, can directly affect population
243 recruitment.

244 Concerning bacteria and fungi, a higher number of investigations concerning captive
245 elasmobranchs is noted compared to animals in natural environments, although a higher
246 microbial diversity has been reported for free-living elasmobranchs. This suggests that marine
247 contamination may be a significant contributor to microorganism diversity, as aquaria are
248 controlled environments without these types of interferences. In fact, high organic matter
249 discharges into coastal ecosystems have become a significant public health issue (Robinson
250 et al., 2016; Fresia et al., 2019), as these effluents contain several contaminants, such as metals,
251 hydrocarbons, pharmaceutically active organic compounds (Bayen et al., 2019) and endocrine
252 disruptors (Santos et al., 2019), in addition to pathogenic microorganisms (Poharkar et al.,
253 2017). In this regard, wastewater can comprise both a reservoir and vehicle for the
254 transmission of pathogenic bacteria and antibiotic resistance mechanisms to aquatic biota,
255 leading to serious consequences for exposed animals, including global declines in fish stocks
256 (Landrigan et al. 2020), and, consequently, to humans, as many contaminated fish species are
257 routinely marketed and consumed. Furthermore, it seems that the bacterial community of rays
258 from the natural environment is complex, with a high diversity of microbiota taxa, some
259 establishing beneficial symbiotic associations and others responsible for diseases in humans
260 and other animals, including fish (Gonçalves and Silva et al., 2020).

261 **Conclusions**

262 The findings reported herein indicate a significant lack of information concerning
263 elasmobranch-associated microbiota, more critical regarding fungi. (i) In this regard, the
264 prevalence of *Fusarium solani* was observed in the evaluated literature, while the bacteria
265 genera *Mycobacterium* and *Vibrio* were the most noteworthy. (ii) The most analyzed
266 elasmobranchs were sharks, with the prevalence of the Scalloped hammerhead *Sphyrna lewini*.
267 Furthermore, (iii) captive elasmobranchs were more investigated than free-living ones.

268 Moreover, (iv) as diverse microbiota has been reported mostly for a single elasmobranch
 269 species, often in a single anatomical area, further studies on the subject are required
 270 encompassing other species and body regions, such as the oral cavity, gastrointestinal tract,
 271 blood, muscle and gills. In sum, elasmobranch-associated microbiota evaluations comprise a
 272 valuable tool concerning elasmobranch health, as this group is susceptible to bacterial and
 273 fungal diseases both in the wild and in captivity. However, (v) although concerns have been
 274 noted regarding emerging diseases for this ancient group of fish, this subject is still poorly
 275 understood, and scarce information on the biodiversity, prevalence and physiological effects of
 276 the microbiota associated with cartilaginous fish is available, indicating the need for further
 277 investigations in this field of research. As such, (vi) the potential zoonotic of this significant
 278 diversity of microorganisms detected in elasmobranchs should be further evaluated in a fast-
 279 changing world.

280 **References**

- 281
 282 Anderson ET, Frasca S, Asakawa MG, Fatzinger MH, Johnson J, Marchetere K, Goodale L,
 283 Risatti GR, Harms CA. 2012. Splenic mycobacteriosis in an Atlantic guitarfish,
 284 *Rhinobatos lentiginosus* Garman. *Journal of Fish Diseases* 35(7): 541–544.
 285 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01367.x>
- 286 Bang C, Dagan T, Deines P, Dubilier N, Duschl WJ, Fraune S, Hentschel U, Hirt H, Hülter N,
 287 Lachnit T, Picazo D, Pita L, Pogoreutz C, Rådecker N, Saad MM, Schmitz RA,
 288 Schulenburg H, Voolstra CR, Weiland-Bräuer N, Ziegler M, Bosch T. CG. 2018.
 289 Metaorganisms in extreme environments: do microbes play a role in organismal
 290 adaptation? *Zoology* 127: 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.02.004>
- 291 Bayen S, Segovia Estrada E, Zhang H, Lee WK, Juhel G, Smedes F, Kelly BC. 2019.
 292 Partitioning and bioaccumulation of legacy and emerging hydrophobic organic
 293 chemicals in Mangrove Ecosystems. *Environmental Science & Technology* 53: 2549–
 294 2558. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06122>.
- 295 Bindiya ES, Tina KJ, Raghul SS, Bhat SG. 2015. Characterization of Deep Sea Fish Gut
 296 Bacteria with Antagonistic Potential, from *Centroscyllium fabricii* (Deep Sea Shark).
 297 *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 7(2): 157–163. [https://doi.org/10.1007/s12602-](https://doi.org/10.1007/s12602-015-9190-x)
 298 015-9190-x
- 299 Buck JD. 1990. Potentially pathogenic marine *Vibrio* species in seawater and marine
 300 animals in the Sarasota, Florida, Area. *Journal of Coastal Research* 6(4): 943–8.
- 301 Caballero S, Galeano AM, Lozano JD, Vives M. 2020. Description of the microbiota in
 302 epidermal mucus and skin of sharks (*Ginglymostoma cirratum* and *Negaprion*
 303 *brevirostris*) and one stingray (*Hypanus americanus*). *PeerJ* 8.
 304 <https://doi.org/10.7717/peerj.10240>
- 305 Camus A, Berliner A, Clauss T, Hatcher N, Marancik D. 2013. *Serratia marcescens*
 306 associated ampullary system infection and septicemia in a bonnethead shark, *Sphyrna*
 307 *tiburo* (L.). *Journal of Fish Diseases* 36(10): 891–895. <https://doi.org/10.1111/jfd.12107>
- 308 Camus A, Dill J, McDermott A, Hatcher N, Griffin M. 2016. *Edwardsiella piscicida*-
 309 associated septicemia in a blotched fantail stingray *Taeniura meyeni* (Müller & Henle).

- 310 *Journal of fish diseases* 39(9): 1125–1131. <https://doi.org/10.1111/jfd.12435>
- 311 Clarke EO, Dorn B, Boone A, Risatti G, Gilbert-Marcheterre K, Harms CA. 2013.
- 312 Mycobacteriosis, mycobacterium chelonae, in a captive yellow stingray (*Urobatis*
- 313 *Jamaicensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44(2): 470–474.
- 314 <https://doi.org/10.1638/2012-0018R2.1>
- 315 Crow GL, Brock JA, Kaiser S. 1995. *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal
- 316 system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. *Journal of*
- 317 *wildlife diseases* 31(4): 562–565. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.4.562>
- 318 Delaune AJ, Anderson CE. 2020. Diagnosis and treatment of an enterococcus fecalis abscess
- 319 in the cranial vault of a spotted eagle ray (*Aetobatus Narinari*). *Journal of Zoo and*
- 320 *Wildlife Medicine* 51(1): 249–252. <https://doi.org/10.1638/2019-0155>
- 321 Desoubeaux G, Debourgogne A, Wiederhold NP, Zaffino M, Sutton D, Burns RE, Frasca Jr
- 322 S, Hyatt MW, Cray C. 2017. Multi-locus sequence typing provides epidemiological
- 323 insights for diseased sharks infected with fungi belonging to the *Fusarium solani* species
- 324 complex. *Medical Mycology* 56(5): 591–601. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx089>
- 325 Diamant A, Goren M, Yokeş MB, Galil BS, Klopman Y, Huchon D, Szitenberg A, Karhan
- 326 SÜ. 2010. *Dasyatispora levantinae* gen. et sp. nov., a new microsporidian parasite from
- 327 the common stingray *Dasyatis pastinaca* in the eastern Mediterranean. *Diseases of*
- 328 *Aquatic Organisms* 91(2): 137–150. <https://doi.org/10.3354/dao02256>
- 329 Doane MP, Haggerty JM, Kacev D, Papudeshi B, Dinsdale EA. 2017. The skin microbiome
- 330 of the common thresher shark (*Alopias vulpinus*) has low taxonomic and gene function
- 331 β -diversity. *Environmental Microbiology Reports* 9(4): 357–373.
- 332 <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12537>
- 333 Doane MP, Morris MM, Papudeshi B, Allen L, Pande D, Haggerty JM, Johri S, Turnlund AC,
- 334 Peterson M, Kacev D, Nosal A, Ramirez D, Hovel K, Ledbetter J, Alker A, Avalos J,
- 335 Baker K, Bhide S, Billings E, Byrum S, Clemens M, Demery AJ, Lima LFO, Gomez O,
- 336 Gutierrez O, Hinton S, Kieu D, Kim A, Loaiza R, Martinez A, McGhee J, Nguyen K,
- 337 Parlan S, Pham A, Price-Waldman R, Edwards RA, Dinsdale EA. 2020. The skin
- 338 microbiome of elasmobranchs follows phylosymbiosis, but in teleost fishes, the
- 339 microbiomes converge. *Microbiome* 8(1): 1–15. [https://doi.org/10.1186/s40168-020-](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00840-x)
- 340 [00840-x](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00840-x)
- 341 Egan S, Gardiner M. 2016. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems.
- 342 *Frontiers in Microbiology* 7: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00991>
- 343 Eisenberg, T., Riße, K., Schauerte, N., Geiger, C., Blom, J., & Scholz, H. C. (2017). Isolation
- 344 of a novel ‘atypical’ *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*).
- 345 *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular*
- 346 *Microbiology* 110(2): 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0792-4>
- 347 Erlacher-Reid CD, Nollens HH, Schmitt TL, St Leger J, Sunico S. 2016. Phaeohyphomycosis
- 348 associated with ossification of the skull and cervical vertebrae in a swell shark
- 349 (*Cephaloscyllium ventriosum*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 47(4): 1081–1085.
- 350 <https://doi.org/10.1638/2016-0032.1>
- 351 Escobar LE, Ryan SJ, Stewart-Ibarra AM, Finkelstein JL, King CA, Qiao H, Polhemus ME.
- 352 2015. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future
- 353 climate conditions. *Acta Tropica* 149: 202–211. [https://doi.](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028)
- 354 [org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028)
- 355 Fernando N, Hui SW, Tsang CC, Leung SY, Ngan AHY, Leung RWW, Ngan AHY, Leung
- 356 RWW, Groff JM, Lau SKP, Woo PCY. 2015. Fatal *Fusarium solani* species complex

- 357 infections in elasmobranchs: The first case report for black spotted stingray (*Taeniura*
358 *melanopsila*) and a literature review. *Mycoses* 58(7): 422–431.
359 <https://doi.org/10.1111/myc.12342>
- 360 Florio D, Gridelli S, Fioravanti ML, Zanoni RG. 2016. First Isolation of *Tenacibaculum*
361 *Maritimum* in A Captive Sand Tiger Shark (*Carcharias Taurus*). *Journal of Zoo and*
362 *Wildlife Medicine* 47(1): 351–353. <https://doi.org/10.1638/2015-0064.1>
- 363 Givens CE, Ransom B, Bano N, Hollibaugh JT. 2015. Comparison of the gut microbiomes of
364 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series* 518: 209–223.
365 <https://doi.org/10.3354/meps11034>
- 366 Gonçalves e Silva, F, Dos Santos HF, De Assis Leite DC, Lutfi DS, Vianna M, Rosado AS.
367 2020. Skin and stinger bacterial communities in two critically endangered rays from the
368 South Atlantic in natural and aquarium settings. *Microbiology Open* 9(12): 1–16.
369 <https://doi.org/10.1002/mbo3.1141>
- 370 Interaminense J, Nascimento D, Ventura R, Batista J, Souza M, Hazin F, Pontes-Filho N,
371 Lima-Filho J. 2010. Recovery and screening for antibiotic susceptibility of potential
372 bacterial pathogens from the oral cavity of shark species involved in attacks on humans in
373 Recife, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 59(8): 941–7.
374 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020453-0>
- 375 Janse M, Kik MJL. 2012. *Mycobacterium avium* granulomas in a captive epaulette shark,
376 *hemiscyllium ocellatum* (bonnaterre). *Journal of Fish Diseases* 35(12): 935–940.
377 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01444.x>
- 378 Johny TK, Saidumohamed BE, Sasidharan RS, Bhat SG. 2018. Metabarcoding data of
379 bacterial diversity of the deep sea shark, *Centroscyllium fabricii*. *Data in Brief* 21: 1029–
380 1032. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.062>
- 381 Juste-Poinapen NMS, Yang L, Ferreira M, Poinapen J, Rico C. 2019. Community profiling of
382 the intestinal microbial community of juvenile Hammerhead Sharks (*Sphyrna lewini*)
383 from the Rewa Delta, Fiji. *Scientific Reports* 9(1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43522-x>
- 385 Kearns PJ, Bowen JL, Tlusty MF. 2017. The skin microbiome of cow-nose rays (*Rhinoptera*
386 *bonasus*) in an aquarium touch-tank exhibit. *Zoo Biology* 36(3):226–30.
387 <https://doi.org/10.1002/zoo.21362>
- 388 Landrigan PJ, Stegeman JJ, Fleming LE, Allemand D, Anderson DM, Backer LD, Brucker-
389 Davis F, Chevalier N, Corra L, Czerucka D, Bottein MYD, Demeneix B, Depledge M,
390 Deheyn DD, Dorman CJ, Fénichel P, Fisher S, Gaill F, Galgani F, Gaze WH, Giuliano
391 L, Grandjean P, Hahn ME, Hamdoun A, Hess P, Judson B, Laborde A, McGlade J, Mu
392 J, Mustapha A, Neira M, Noble RT, Pedrotti ML, Reddy C, Rocklöv J, Scharler UM,
393 Shanmugam H, Taghian G, Van de Water JAJM, Vezzulli L, Weihe P, Zeka A, Raps H,
394 Rampal P. 2020. Human Health and Ocean Pollution. *Annals of Global Health* 86(1):
395 1–64. <https://doi.org/10.5334/aogh.2831>
- 396 Leigh SC, Papastamatiou YP, German DP. 2021. Gut microbial diversity and digestive
397 function of an omnivorous shark. *Marine Biology* 168: 55.
398 <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03866-3>
- 399 Liu QQ, Wang Y, Li J, Du ZJ, Chen GJ. 2014. *Saccharicrinis carchari* sp. nov., isolated from
400 a shark, and emended descriptions of the genus *Saccharicrinis* and *Saccharicrinis*
401 *fermentans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:
402 2204–2209. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.061986-0>
- 403 Marancik DP, Berliner AL, Cavin JM, Clauss TM, Dove ADM, Sutton DA, Wickes BL,
404 Camus AC. 2011. Disseminated fungal infection in two species of captive sharks.
405 *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42(4): 686–693.

- 406 0175.1
- 407 Mylniczenko ND, Harris B, Wilborn RE, Young FA. 2007. Blood culture results from healthy
408 captive and free-ranging elasmobranchs. *Journal of Aquatic Animal Health* 19(3): 159–
409 167. <https://doi.org/10.1577/H06-039.1>
- 410 Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, Two AM, Yun T, Shafiq F, Kotel PF, Bouslimani
411 A, Melnik AV, Latif H, Kim J-N, Lockhart A, Artis K, David G, Taylor P, Streib J,
412 Dorrestein PC, Grier A, Gill SR, Zengler K, Hata TR, Leung DYM, Gallo RL. 2017.
413 Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus*
414 *aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, 9(378): 1–
415 12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- 416 Nogales B, Lanfranchi MP, Pina-Villalonga JM, Bosch R. 2011. Anthropogenic
417 perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* 35(2):
418 275–298.
- 419 Pacoureaux N, Rigby CL, Kyne PM, Sherley RB, Winker H, Carlson JK, Fordham SV, Barreto
420 R, Fernando D, Francis MP, Jabado RW, Herman KB, Liu K-M, Marshall AD, Pollom
421 RA, Romanov EV, Simpfendorfer CA, Yin JS, Kindsvater HK, Dulvy NK. 2021. Half a
422 century of global decline in oceanic sharks and rays. *Nature* 589.
423 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03173-9>
- 424 Perry, CT, Pratte, ZA, Clavere-Graciette, A *et al.* Elasmobranch microbiomes: emerging
425 patterns and implications for host health and ecology. *anim microbiome* 3, 61 (2021).
426 <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00121-4>
- 427 Pirarat N, Sahatrakul K, Lacharoje S, Lombardini E, Chansue N, Techangamsuwan S. 2016.
428 Molecular and pathological characterization of *Fusarium solani* species complex
429 infection in the head and lateral line system of *Sphyrna lewini*. *Diseases of Aquatic*
430 *Organisms* 120(3): 195–204. <https://doi.org/10.3354/dao03028>
- 431 Pogoreutz C, Gore MA, Perna G, Millar C, Nestler R, Ormond RF, Clarke CR, Voolstra CR.
432 2019. Similar bacterial communities on healthy and injured skin of black tip reef sharks.
433 *Animal Microbiome* 1(1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0011-5>
- 434 Poharkar K, Doijad S, Kerkar S, Barbudde S. 2017. Pathogenic bacteria of public health
435 significance in estuarine mangrove ecosystem. *Marine Pollution and Microbial* 239–
436 253. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6_15
- 437 Reid G, Younes JA, Van Der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. 2011. Microbiota
438 restoration: Natural and supplemented recovery of human microbial communities.
439 *Nature Reviews Microbiology* 9(1): 27–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2473>
- 440 Ritchie KB, Schwarz M, Mueller J, Lapacek VA, Merselis D, Walsh CJ, Luer CA. 2017.
441 Survey of antibiotic-producing bacteria associated with the epidermal mucus layers of
442 rays and Skates. *Frontiers in Microbiology* 8: 1050.
443 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01050>
- 444 Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J,
445 Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Ngoc PT, Boeckelo
446 TPV, Woolhouse MEJ. 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health
447 issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110(7): 377–
448 380.
- 449 Santos FR, Martins DA, Morais PCV, Oliveira AHB, Gama AF, Nascimento RF, Choi-Lima
450 KF, Moreira LB, Abessa DMS, Nelson RK, Reddy CM., Swarthout RF, Cavalcante RM.
451 2019. Influence of anthropogenic activities and risk assessment on protected mangrove
452 forest using traditional and emerging molecular markers (Ceará coast, northeastern
453 Brazil). *Science of the Total Environment* 656: 877–888.

- 454 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.380>.
- 455 Schaffer PA, Lifland B, Van Sommeran S, Casper DR, Davis CR. 2012. Meningoencephalitis
456 Associated With *Carnobacterium maltaromaticum*-Like Bacteria in Stranded Juvenile
457 Salmon Sharks (*Lamna ditropis*). *Veterinary Pathology* 50(3): 412–417.
458 <https://doi.org/10.1177/0300985812441033>
- 459 Sehnal, L, Brammer-Robbins E, Wormington AM, Blaha L, Bisesi J, Larkin I, Martyniuk CJ,
460 Simonin M, Adamovsky O. 2021. Microbiome Composition and Function in Aquatic
461 Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Frontiers*
462 *in microbiology* 12: 67408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.567408>
- 463 Storo R, Easson C, Shivji M, Lopez JV. 2021. Microbiome Analyses Demonstrate Specific
464 Communities Within Five Shark Species. *Frontiers in Microbiology* 12: 1–10.
465 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.605285>
- 466 Tuxbury KA, Young SA, Bradway DS, Marola JL, Salfinger M, Garner MM. 2017. Acute
467 disseminated mycobacteriosis in captive Atlantic guitarfish (*Rhinobatos lentiginosus*).
468 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29(6): 935–938.
469 <https://doi.org/10.1177/1040638717721731>
- 470 Unger NR, Ritter E, Borrego R, Goodman J, Osiyemi OO. 2014. Antibiotic susceptibilities of
471 bacteria isolated within the oral flora of Florida blacktip sharks: Guidance for empiric
472 antibiotic therapy. *PLoS ONE* 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104577>
- 473 Ward JR, Lafferty KD. 2004. The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean
474 ecosystems increasing?. *PLoS Biology* 2(4): 542–547.
475 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020120>
- 476 Wilkins LGE, Leray M, O’Dea A, Yuen B, Peixoto RS, Pereira TJ, Bik HM, Coil DA, Duffy
477 JE, Herre EA, Lessios H, Lucey NM, Mejia LC, Rasher DB, Sharp K, Sogin, EM,
478 Thacker RW, Thurber RV, Wcislo WT, Wilbanks EG, Eisen JA. 2019. Host-associated
479 microbiomes drive structure and function of marine ecosystems. *PLoS Biology* 17(11):
480 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000533>
- 481 Xu ZX, Liang QY, Lu DC, Chen GJ, Du ZJ. 2016. *Pistricoccus aurantiacus* gen. nov., sp.
482 nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a shark. *Antonie van*
483 *Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 109(12):
484 1593–1603. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0760-z>
- 485 Zhang Q, Mu J, Essmann F, Feng Y, Kramer M, Bao H, Grond S. 2011. Acceleration of
486 emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science*
487 333(6050): 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1208747>

488

489

490

491

492

493

494

495

496

Table 1. Elasmobranch-associated microbiota studies published between 1990 and 2021 focusing on fungi.

Fungus (taxon)	Host elasmobranch species	Host body area	Reference
<i>Fusarium solani</i>	<i>Sphyrna lewini</i>	Head and lateral line	Crow, Brock, & Kaiser (1995)
<i>Dasyatispora levantinae</i>	<i>Dasyatis pastinaca</i>	Skeletal musculature	Diamant et al. (2010)
<i>Paecilomyces lilacinus</i> ^a , <i>Mucor circinelloides</i> ^b , <i>Exophiala pisciphila</i> ^{b*}	<i>Sphyrna mokarran</i> , <i>Stegostoma fasciatum</i>	Liver, heart, kidney, spleen and gills	Marancik et al. (2011)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taeniura melanopsila</i> ^c , <i>Sphyrna lewini</i> ^d	Ventral pectoral fin, head and lateral line	Fernando et al. (2015)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Sphyrna lewini</i>	Head and lateral line	Pirarat et al. (2016)
<i>Exophiala</i> sp.	<i>Cephaloscyllium ventriosum</i>	Head	Erlacher-Reid et al. (2016)
<i>Fusarium keratoplasticum</i> , <i>Fusarium solani</i> e <i>Metarhizium robertsii</i>	<i>Sphyrna lewini</i> , <i>Sphyrna tiburo</i>	Head and lateral line	Desoubeaux et al. (2018)

^a *Sphyrna mokarran* (Liver, heart and gills), ^{b,b*} *Stegostoma fasciatum* (Liver, kidney, spleen and gills), ^cVentral pectoral fin, ^d Head and lateral line.

Table 2. Elasmobranch-associated microbiota studies published between 1990 and 2021 focusing on bacteria.

Bacteria (taxon)	Host elasmobranch species	Host body area	Reference
<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. damsela</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Carcharhinus plumbeus</i> ^a , <i>Negaprion brevirostris</i> ^b , <i>Carcharhinus limbatus</i> ^c , <i>Carcharhinus brevipinna</i> ^d , <i>Carcharhinus leucas</i> ^e , <i>Ginglymostoma cirratum</i> ^f , <i>Raja eglanteria</i> ^g , <i>Dasyatis americana</i> ^h	Intestine, teeth, gills, spine	Buck (1990)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Carcharhinus melanopterus</i>	Fins, gills, intestine, liver and kidneys	Briones et al. (1998)
<i>Vibrio</i> spp.	<i>Sphyrna lewini</i>	Cephalic canals and lateral line	Crow, Brock, & Kaiser (1995)
<i>Photobacterium damsela</i> ^l , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ^l , <i>Vibrio alginolyticus</i> ^k	<i>Carcharhinus melanopterus</i> , <i>Triaenodon obesus</i> , <i>Himantura granulata</i> , <i>Carcharhinus limbatus</i> , <i>Orectolobus japonicus</i> , <i>Carcharhinus acronotus</i> , <i>Carcharhinus plumbeus</i> , <i>Cephaloscyllium</i> <i>ventriosum</i> , <i>Chiloscyllium plagiosum</i> , <i>Triakis</i> <i>semifasciata</i>	Blood	Mylniczenko et al. (2007)
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Moellerella wisconsinensis</i> , <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter farmeri</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Leclercia adecarboxylata</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Carcharhinus leucas</i> ^l , <i>Galeocerdo cuvier</i> ^m	Oral cavity	Interaminense et al. (2010)
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	Oral cavity, clasper, liver, spleen and intestine	Janse & Kik (2012)
<i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	<i>Rhinobatos lentiginosus</i> <i>Lamna ditropis</i>	Spleen and skin Brain, blood, liver and heart	Anderson et al. (2012) Schaffer et al. (2012)
<i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Urobatis jamaicensis</i> <i>Sphyrna tiburo</i>	Dorsal face and spiracle Blood, skin, liver, kidney, spleen and brain	Clarke et al. (2013) Camus et al. (2013)
<i>Saccharicrinis carchari</i> , <i>Saccharicrinis fermentans</i> <i>Vibrio</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp. <i>Vibrio</i> spp., <i>Pseudoalteromonas</i> spp., <i>Arenibacter</i> spp., <i>Nautella</i> spp., <i>Amphritea</i> spp., <i>Shewanella</i> spp. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Cetorhinus maximus</i> <i>Carcharhinus limbatus</i> <i>Narcine bancroftii</i> <i>Centroscyllium fabricii</i>	Gills Oral cavity Blood Intestine	Liu et al. (2014) Unger et al. (2014) Tao, Bullard & Arias (2014) Bindiya et al. (2015)

<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria,</i>	<i>Carcharhinus brevipinnaⁿ, Rhizoprionodon terraenovae^o, Carcharhinus plumbeus^p</i>	Intestine	Givens et al. (2015)
<i>Edwardsiella piscicida</i>	<i>Taeniura meyeni</i>	Heart, intestine, kidney, liver and spleen	Camus et al. (2016)
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	<i>Carcharias taurus</i>	Skin	Florio et al. (2016)
<i>Pistricoccus aurantiacus</i>	<i>Cetorhinus maximus</i>	Gills	Xu et al. (2016)
Burkholderiales, Flavobacteriales, Pseudomonadales	<i>Rhinoptera bonasus</i>	Skin	Kearns, Bowen & Tlusty (2017)
Microbacterium sp., Stenotrophomonas sp., Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas putida, Psychrobacter pacificensis, Bacillus cereus, Pseudomonas sp., Photobacterium damsela, Vibrio harveyi, Photobacterium sp., Vibrio sp., Pseudoalteromonas sp., Alteromonas sp., Exiguobacterium sp., Bacillus sp., Lysinibacillus sp., Halomonas sp., Bacillus megaterium, Psychrobacter celer, Psychrobacter sp., Marinobacter hydrocarbonoclasticus, Shewanella sp., Marinobacter sp., Vibrio maritimus, Vibrio parahaemolyticus, Paracoccus sp., Exiguobacterium sp.	<i>Rhinoptera bonasus^q, Mobula hypostoma^t, Dasyatis sabina^s</i>	Epidermal Mucus	Ritchie et al. (2017)
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Rhinobatos lentiginosus</i>	Gills, blood, spleen, heart, rectal gland and the mesentery	Tuxbury et al. (2017)
<i>Brucella</i> sp.	<i>Taeniura lymma</i>	Gills	Eisenberg et al. (2017)
<i>Pseudoalteromonas</i> spp., <i>Erythrobacter</i> spp., <i>Limnobacter</i> spp., <i>Idiomarina</i> spp., <i>Marinobacter</i> spp.	<i>Alopias vulpinus</i>	Skin	Doane et al. (2017)
<i>Acinetobacter</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Leeuwenhoekella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Talassobacillus</i>	<i>Centroscyllium fabricii</i>	Intestine	Johny et al. (2018)
Enterobacteraceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Bradyrhizobiaceae, Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Staphylococcaceae e Streptococcaceae	<i>Sphyrna lewini</i>	Intestine	Juste-Poinapen et al. (2019)
Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae, Halomonadaceae	<i>Carcharhinus melanopterus</i>	Skin	Pogoreutz et al. (2019)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aetobatus narinari</i>	Head	Delaune & Anderson (2020)
Actinomycetales	<i>Ginglymostoma cirratum, Negaprion brevirostris, Hypanus americanus</i>	Mucus and skin	Caballero et al. (2020)
Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria	<i>Alopias vulpinus, Rhincodon typus, Triakis semifasciata, Urolophus halleri</i>	Skin	Doane et al. (2020)

<i>Oceanimonas</i> , <i>Sediminibacterium</i> , <i>Cohaesibacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Bacillus</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Erythrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i>	<i>Psychrobacter</i> , <i>Devosia</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Alicyclobacillus</i>	<i>Gymnura altavela</i> ^l , <i>Dasyatis hypostigma</i> ^u	Skin and stinger	Silva et al. (2020)
<i>Haemophilus</i> sp., <i>Kordia</i> sp., <i>Salmonella</i> entérica	<i>Vibrio</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.		<i>Ginglymostoma cirratum</i> , <i>Negaprion brevirostri</i> , <i>Carcharhinus plumbeus</i> , <i>Carcharhinus perezii</i> , <i>Galeocerdo cuvier</i>	Cloaca, gills, skin and teeth	Storo et al. (2021)
<i>Photobacterium</i> <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Heptoplama</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	<i>damselae</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Candidatus</i>	<i>Clostridiaceae</i> , <i>veronii</i> , <i>Candidatus</i> <i>Phyllobacterium</i>	<i>Sphyrna tiburo</i>	Intestine	Leigh, Papastamatiou & German (2021)

^aTeeth (*V alginolyticus*, *V parahaemolyticus*), ^bTeeth (*V alginolyticus*, *V parahaemolyticus*), ^cTeeth (*V alginolyticus*, *V parahaemolyticus*), ^dTeeth (*V alginolyticus*), ^eTeeth (*V alginolyticus*), ^f*V alginolyticus* (gills, intestine, teeth), ^gTeeth (*V alginolyticus*), ^h*V alginolyticus* (spine, teeth).

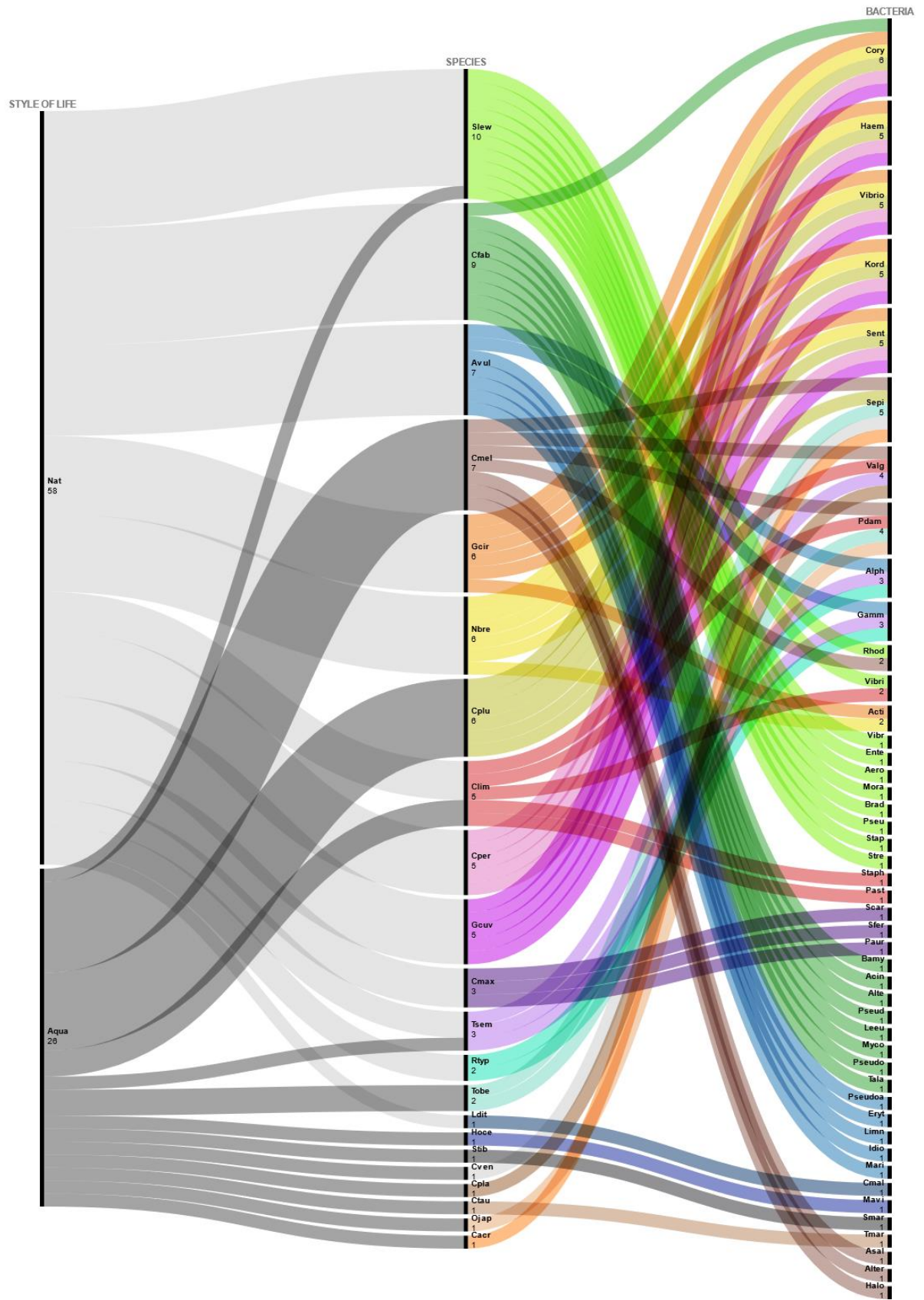
ⁱ*Carcharhinus melanopterus*, *Triaenodon obesus*, *Himantura granulata*, *Carcharhinus limbatus*, *Orectolobus japonicus*, ^j*Carcharhinus melanopterus*, *Triaenodon obesus*, *Carcharhinus acronotus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Cephaloscyllium ventriosum*, ^k*Carcharhinus melanopterus*, *Himantura granulata*, *Carcharhinus limbatus*, *Chiloscyllium plagiosum*, *Triakis semifasciata*.

^l*Carcharhinus leucas* (*Citrobacter farmeri*, *Proteus vulgaris*, *Leclercia adecarboxylata*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus*), ^m*Galeocerdo cuvier* (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Proteus mirabilis*, *Moellerella wisconsinensis*, *Providencia alcalifaciens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus*, *Enterococcus*).

ⁿ*Carcharhinus brevipinna* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*), ^o*Rhizoprionodon terraenovae* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*), ^p*Carcharhinus plumbeus* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*).

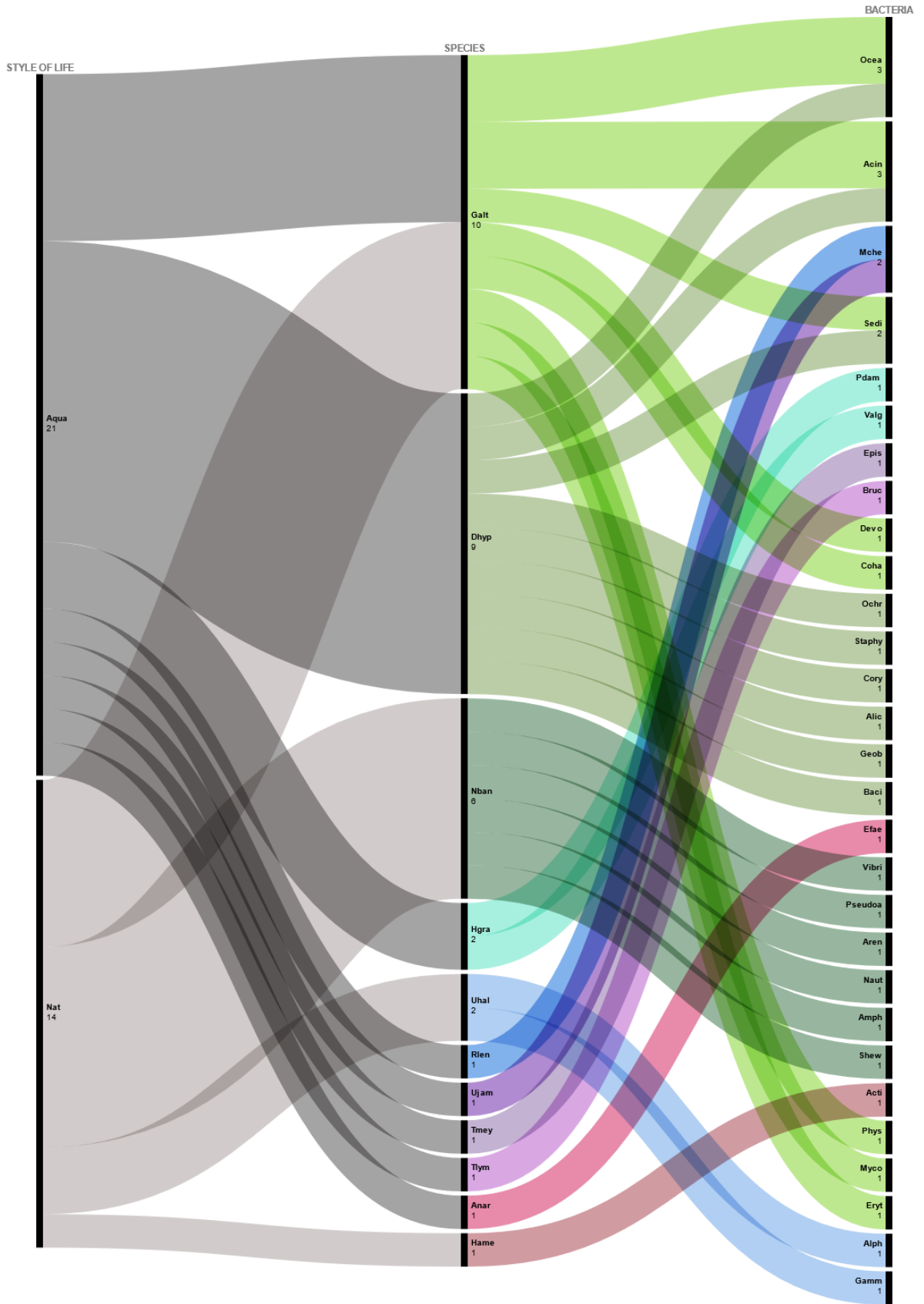
^q*Rhinoptera bonasus* (*Exiguobacterium* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Halomonas* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Psychrobacter celer*, *Psychrobacter* sp., *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Alteromonas* sp., *Shewanella* sp., *Marinobacter* sp., *Vibrio maritimus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Paracoccus* sp., *Exiguobacterium* sp.), ^r*Mobula hypostoma* (*Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Alteromonas* sp.), ^s*Dasyatis sabina* (*Microbacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Psychrobacter pacificensis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio harveyi*, *Photobacterium* sp., *Vibrio* sp.).

Figure 1. Bacteria isolated from sharks from both aquaria and natural environments.



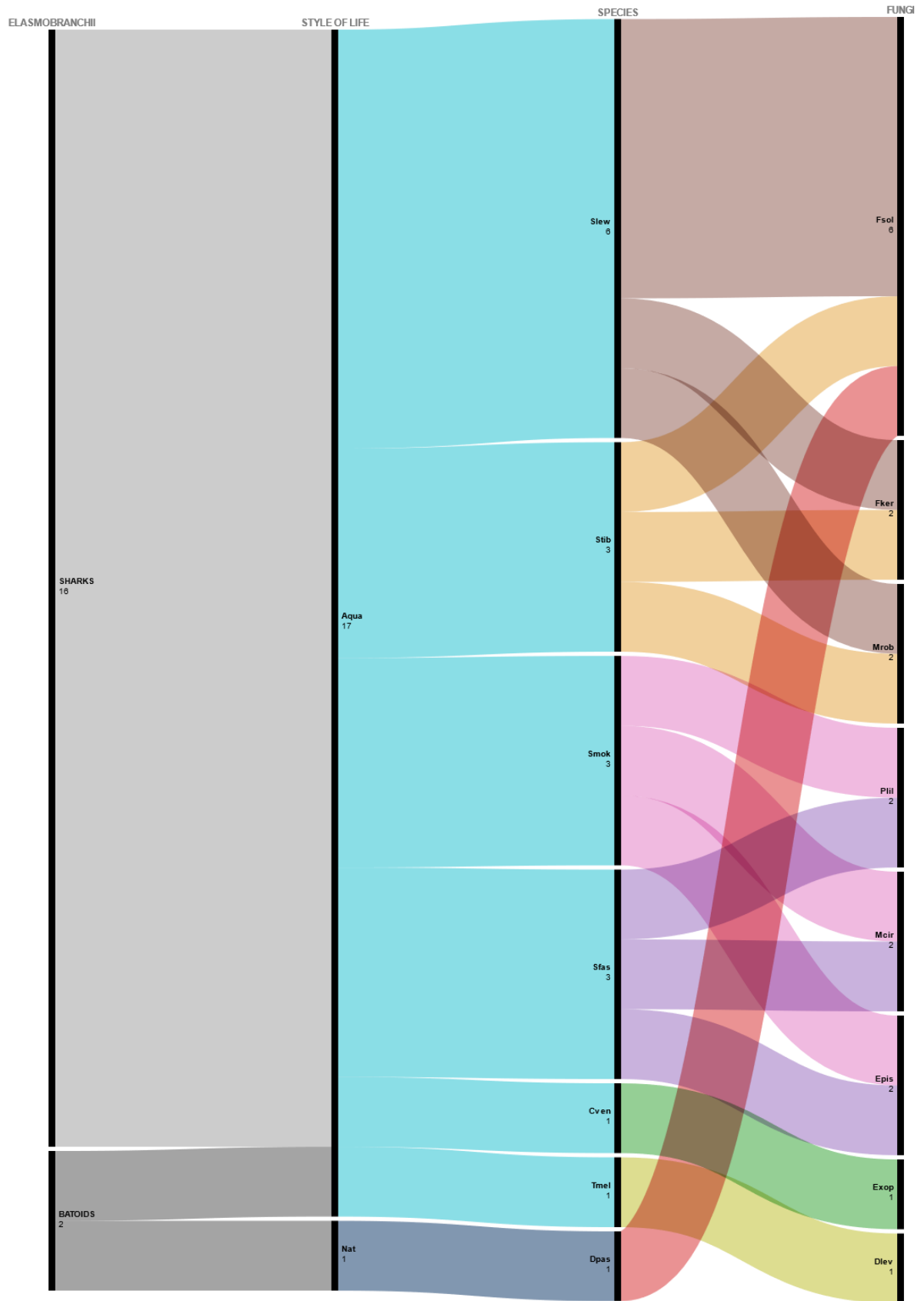
Legends: Environment: Nat: Natural; Aqua: Aquaria. **Sharks species:** Slev: *Sphyrna lewini*; Cfab: *Centroscyllum fabricii*; Avul: *Alopias vulpinus*; Cmel: *Carcharhinus melanopterus*; Gcir: *Ginglymostoma cirratum*; Nbre: *Negaprion brevirostris*; Cplu: *Carcharhinus plumbeus*; Clim: *Carcharhinus limbatus*; Cper: *Carcharhinus perezii*; Gcuv: *Galeocerdo cuvier*; Cmax: *Cetorhinus maximus*; Tsem: *Triakis semifasciata*; Rtyp: *Rhincodon typus*; Tobe: *Triaenodon obesus*; Ldit: *Lamna ditropis*; Hoco: *Hemiscyllum ocellatum*; Stib: *Sphyrna tiburo*; Cven: *Cephaloscyllum ventriosum*; Cpla: *Chiloscyllum plagiosum*; Ctau: *Carcharias taurus*; Ojap: *Orectolobus japonicus*; Cacr: *Carcharhinus acronotus*. **Bacteria isolated:** Cory: *Corynebacterium* sp; Haem: *Haemophilus* sp.; Vibrio: *Vibrio* sp.; Kord: *Kordia* sp.; Sent: *Salmonella enterica*; Sepi: *Staphylococcus epidermidis*; Valg: *Vibrio alginolyticus*; Pdam: *Photobacterium damsela*; Alph: Alphaproteobacteria; Gamm: Gammaproteobacteria; Rhod: Rhodobacteraceae; Vibri: *Vibrio* spp.; Acti: Actinomycetales; Vibr: Vibrionaceae; Ente: Enterobacteraceae; Aero: Aeromonadaceae; Mora: Moraxellaceae; Brad: Bradyrhizobiaceae; Pseu: Pseudomonadaceae; Stap: Staphylococcaceae; Stre: Streptococcaceae; Staph: *Staphylococcus* spp.; Past: *Pasteurella* spp; Scar: *Saccharicrinis carchari*; Sfer: *Saccharicrinis fermentans*; Paur: *Pistricoccus aurantiacus*; Bamy: *Bacillus amyloliquefaciens*; Acin: *Acinetobacter*; Alte: *Alteromonas* sp.; Pseud: *Pseudonocardia* sp; Leeu: *Leeuwenhoekiella* sp; Myco: *Mycobacterium* sp.; Pseudo: *Pseudomonas* sp; Tala: *Talassobacillus* sp.; Pseudoa: *Pseudoalteromonas* spp.; Eryt: *Erythro bacter* spp.; Limn: *Limnobacter* spp.; Idio: *Idiomarina* spp.; Mari: *Marinobacter* spp.; Cmal: *Carnobacterium maltaromaticum*; Mavi: *Mycobacterium avium*; Smar: *Serratia marcescens*; Tmar: *Tenacibaculum maritimum*; Asal: *Aeromonas salmonicida*; Alter: Alteromonadaceae; Halo: Halomonadaceae.

Figure 2. Bacteria isolated from batoids from both aquaria and natural environments.



Legends: Environment: Nat: Natural; Aqua: Aquaria. **Batoids species:** Galt: *Gymnura altavela*; Dhyp: *Dasyatis hypostigma*; Nban: *Narcine bancroftii*; Hgra: *Himantura granulata*; Uhal: *Urolophus halleri*; Rlen: *Rhinobatos lentiginosus*; Ujam: *Urobatis jamaicensis*; Tmey: *Taeniura meyeni*; Tlym: *Taeniura lymma*; Anar: *Aetobatus narinari*; Hypanus *americanus*; **Bacteria isolated:** Ocea: Oceanimonas; Acin: Acinetobacter; Mche: *Mycobacterium chelonae*; Sedi: Sediminibacterium; Pdam: *Photobacterium*; Valg: *Vibrio alginolyticus*; Epis: *Edwardsiella piscicida*; Bruc: *Brucella* sp.; Devo: *Devosia*; Coha: Cohaesibacter; Ochr: Ochrobactrum; Staphy: Staphylococcus; Cory: Corynebacterium; Alic: Alicyclobacillus; Geob: Geobacillus; Baci: Bacillus; Efae: *Enterococcus faecalis*; Vibri: *Vibrio* spp.; Pseudoa: *Pseudoalteromonas* spp.; Aren: *Arenibacter* spp.; Naut: *Nautella* spp.; Amph: *Amphritea* spp.; Shew: *Shewanella* spp.; Acti: Actinomycetales; Phys: Physchrobacter; Myco: Mycobacterium; Eryt: Erythrobacter; Alph: Alphaproteobacteria; Gamm: Gammaproteobacteria.

Figure 3. Fungi isolated from elasmobranchs from both aquaria and natural environments.



Legends: Environment: Nat: Natural; Aqua: Aquaria. **Elasmobranchii species:** Slev: *Sphyrna lewini*; Stib: *Sphyrna tiburo*; Smok: *Sphyrna mokarran*; Sfas: *Stegostoma fasciatum*; Cven: *Cephaloscyllium ventriosum*; Tmel: *Taeniura melanopsila*; Dpas: *Dasyatis pastinaca*; **Fungi isolated:** Fsol: *Fusarium solani*; Fker: *Fusarium keratoplasticum*; Mrob: *Metarhizium robertsii*; Plil: *Paecilomyces lilacinus*; Mcir: *Mucor circinelloides*; Epis: *Exophiala pisciphila*; Exop: *Exophiala* sp; Dlev: *Dasyatispora levantinae*.

Figure 4. Countries that conducted studies with free-living animals from natural environments.

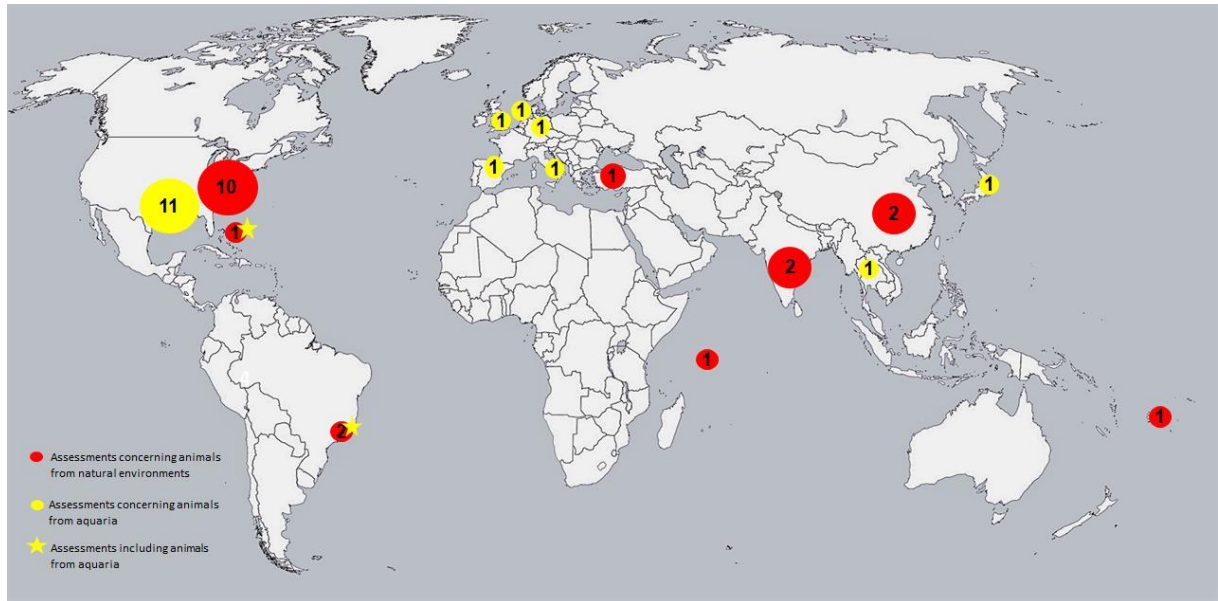
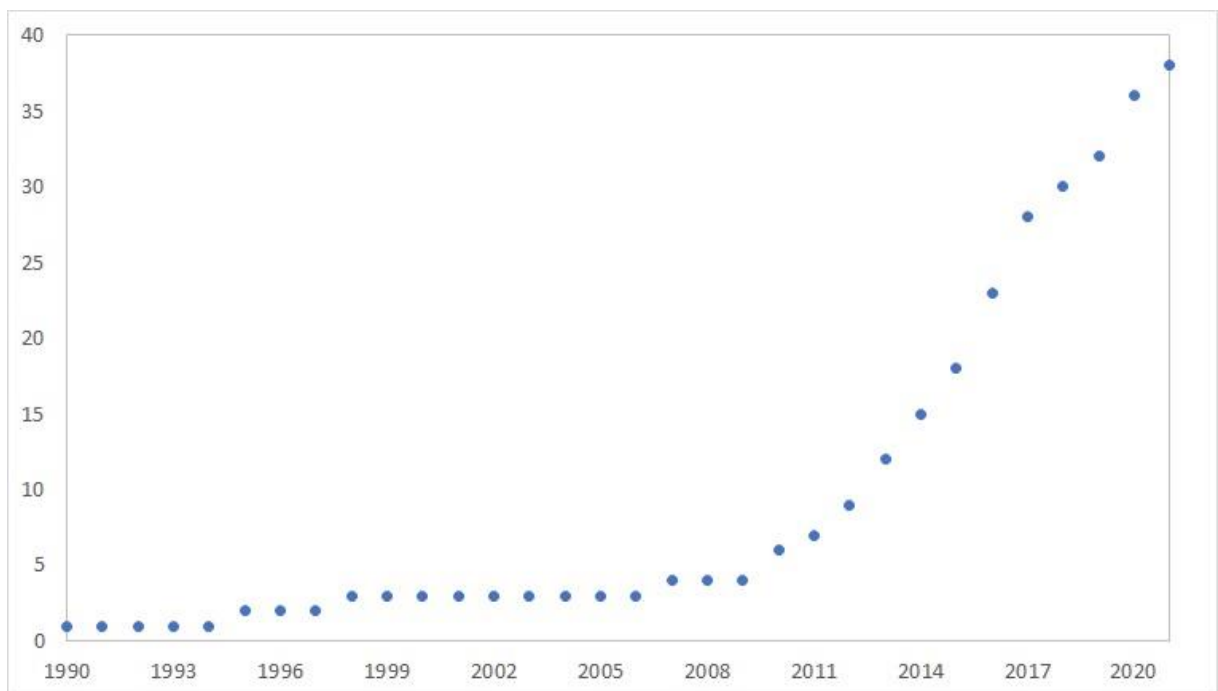


Figure 5. Papers on elasmobranch microbiota published between 1990 and 2021.



CAPÍTULO II

MICROBIOTA INTESTINAL BACTERIANA DE RAIAS E TUBARÕES DO LITORAL AMAZÔNICO BRASILEIRO

Ivana Correia Costa¹, Salvatore Siciliano², Maria Raimunda Chagas Silva³, Jorge Luiz Silva Nunes¹

¹ Laboratório de Organismos Aquáticos/ Universidade Federal do Maranhão, São Luís- Maranhão, Brasil.

² Laboratório de Biodiversidade, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Universidade Ceuma, São Luís, Maranhão, Brasil.

RESUMO

Elasmobrânquios vem enfrentando problemas para manter sua população devido as suas características biológicas e a sobrepesca. Além desses agravantes, a poluição ambiental que cresce a cada ano além de contribuir para a perda de habitat, influencia diretamente na microbiota associada a esses animais. Diante disso, o objetivo do trabalho foi fornecer um *baseline* das espécies de bactérias entéricas de raias e tubarões com diferentes modos de vida presentes no Litoral Amazônico Brasileiro. As análises das amostras foram realizadas baseadas nas normas descritas pelo *American Public Health Association: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. As bactérias entéricas mais frequentes encontradas nos elasmobrânquios analisados foram *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *Serratia* sp, respectivamente com 47%, 38%, 22% e 13%. *Plesionomas shigelloides* *Vibrio gazogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* foram consideradas raras entre as espécies de Elasmobrânquios. A espécie *Hypanus guttatus* foi a que apresentou a maior riqueza de bactérias associadas, sendo possível a identificação de 13 espécies, tendo *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* e *Serratia* sp como as espécies com maior frequência de ocorrência. Conclui-se que a microbiota associada a esse grupo de peixes é diversa sendo possível a identificação de bactérias pertencentes a cinco famílias. Os micro-organismos mais prevalentes foram *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, e a maioria das bactérias isoladas e identificadas na microbiota entérica de tubarões e raias do Litoral Amazônico Brasileiro é registrada pela primeira vez em elasmobrânquios.

Palavras-chave: Tubarões. Raias. Bactéria. Fungo.

INTRODUÇÃO

Elasmobrânquios são fundamentais ao ecossistema marinho, pois muitas das espécies são predadoras do topo da cadeia alimentar, assim, regulam o tamanho da população de suas presas, contribuindo com a manutenção do equilíbrio entre as populações marinhas (HAYATA; BORNATOWSKI; FREITAS, 2021). Por outro lado, muitas espécies de Elasmobrânquios

também enfrentam grandes problemas para manter sua população devido suas características biológicas (*e.g.* ciclo de vida longo, crescimento lento, baixa fecundidade e maturidade sexual tardia (DULVY et al., 2014)), bem como os vários impactos antrópicos emergentes (*e.g.* diminuição de *habitats*, contaminação, sobrepesca) (PACOUREAU et al., 2021; PEGADO et al., 2021; WOSNICK et al., 2021a; WOSNICK et al., 2021b).

Talvez um dos maiores desafios para a conservação de Elasmobrânquios reside na pesca predatória (DULVY et al., 2014; DAVIDSON; KRAWCHUK; DULVY, 2015; PACOUREAU et al., 2021), impulsionada pelo consumo de subprodutos (*e.g.* barbatana e carne) (MARTINS et al., 2018), que muitas vezes não apresentam rotulagem para sua identificação (RANGEL et al., 2021). Em muitos lugares do planeta é possível notar o declínio populacional de muitas espécies (DULVY et al., 2014; DAVIDSON; KRAWCHUK; DULVY, 2015; PACOUREAU et al., 2021).

As espécies de tubarões e raias do Litoral Amazônico Brasileiro também tem refletido o panorama internacional quanto ao declínio e conservação, pois muitas espécies ameaçadas continuam sendo exploradas e vendidas explicitamente em mercados locais (FEITOSA et al., 2018; RODRIGUES FILHO et al., 2020), como *Carcharhinus porosus* e *Ginglymostoma cirratum* (MARTINS et al., 2018).

Além disso, outros fatores também colaboram com o cenário de impactos que catalisam as perdas populacionais de várias espécies de Elasmobrânquios, como a poluição ambiental, que gera perda ou degradação de *habitat*. Esse agravante tem merecido muita atenção devido à contaminação das espécies e ao aumento de doenças infecciosas que contribuem para a redução do número de indivíduos (WARD; LAFFERTY, 2004; POGOREUTZ et al., 2019).

Neste sentido, o manejo inadequado de efluentes domésticos e industriais causam influências diretas na comunidade microbiana existente no ambiente e na microbiota associada aos organismos aquáticos (ABESSA et al., 2012). Organismos patogênicos estão associados à ambientes poluídos, assim como doenças de peixes estão ligadas às infecções causadas por bactérias entéricas fecais (AUSTIN, 2006), portanto, os Elasmobrânquios que consomem presas que vivem em locais poluídos podem refletir a carga bacteriana presente nesse ambiente (JUSTE-POINAPEN et al., 2019).

Os microbiomas têm o potencial de influenciar a saúde, fisiologia e ecologia dos animais marinhos, tendo relação direta em como esses animais se adaptam às mudanças, especialmente, as crescentes alterações relacionadas ao clima, induzidas por processos antropogênicos que vêm impactando o ambiente oceânico (APPRILL, 2017).

A colonização dos microrganismos associados aos peixes pode ter o início na fase de ovo e/ou larval e prosseguir ao longo do desenvolvimento ontogenético (OLAFSEN, 2001; BINDIYA et al., 2015). Assim, a composição quali-quantitativa dos micro-organismos associados aos peixes pode variar temporalmente, alterando a microbiota ao longo do ciclo de vida (BINDIYA et al., 2015).

Apesar da importância dos estudos dessa natureza por refletir a qualidade de vida das espécies de peixes, os trabalhos publicados sobre a microbiota associada a Elasmobrânquios são escassos, tanto no Brasil quanto em outros países, pois o conhecimento acerca da diversidade de micro-organismos ainda é incipiente. Os poucos estudos existentes relatam dados relevantes (GONÇALVES E SILVA et al., 2020), como uma microbiota diversa associada ao intestino, sangue, cavidade oral e pele de algumas espécies de tubarões e raias (TAO; BULLARD; ARIAS, 2014; UNGER et al., 2014; DOANE et al., 2017; JUSTE-POINAPEN et al., 2019), que por vezes estão relacionados com doenças nos animais, causando danos irreversíveis à sua saúde, e em alguns casos, levando-os à morte.

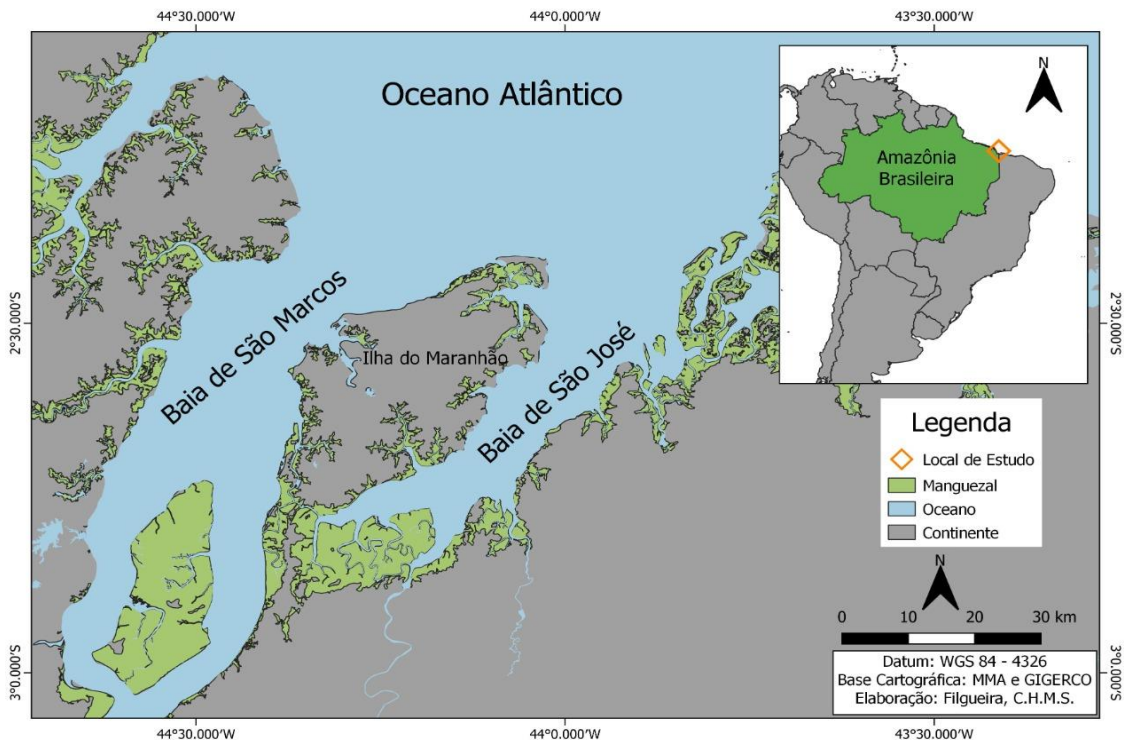
O Litoral Amazônico Brasileiro é considerado um *hotspot* de conservação global de elasmobrânquios, devido à diversidade das espécies e elevado grau de endemismo, que torna esta área importante para a conservação dos elasmobrânquios no âmbito internacional (DULVY et al., 2014; CARRILLO-BRICEÑO et al., 2018). Diante disso, a importância do presente estudo reside na necessidade de compreender a relação ecológica existente entre os elasmobrânquios e sua microbiota, objetivando fornecer um *baseline* das espécies de bactérias entéricas de raias e tubarões com diferentes modos de vida presentes no Litoral Amazônico Brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O Golfão Maranhense está localizado no extremo sul da Costa Amazônica Brasileira, é formado pela baía de São Marcos e São José, compreendendo a Ilha de São Luís (Fig. 1) (TEIXEIRA; SOUZA FILHO, 2009; CASTRO et al., 2018). Toda essa região forma um complexo estuarino que cobre uma área de 5.414 km² (SOUZA FILHO, 2005) e possui um regime macrotidal semidiurno extremo, com amplitude média de maré de 3 a 7 m (TEIXEIRA; SOUZA FILHO, 2009; CASTRO et al., 2018).

Figura 1- Área de estudo das espécies de tubarões e raias capturadas para análise da microbiota de bactérias entéricas no Golfão Maranhense, Litoral Amazônico Brasileiro.



Amostragem

Um total de 45 exemplares foram examinados entre raias e tubarões das seguintes espécies, *Hypanus guttatus* (17), *Rhinoptera bonasus* (16), *Pseudobatus percellens* (3), *Gimnura micrura* (1), *Rhinoptera brasiliensis* (1), *Pristis pristis* (1), *Carcharhinus porosus* (5) e *Sphyrna tudes* (1).

A amostragem da microbiota foi realizada a partir do esfregaço cloacal em cada indivíduo após o desembarque, em seguida levados ao Laboratório de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Maranhão. O *swab* utilizado na amostragem possuía o meio de cultura *Cary Blair* (específico para o transporte), em recipiente plástico em temperatura em torno de 25°C. Cada *swab* foi identificado e continha como descrição, numeração de cada indivíduo, data e espécie.

Posteriormente as amostras foram enviadas ao Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/ FIOCRUZ) para realização do isolamento e identificação de bactérias.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas baseadas nas normas descritas pelo *American Public Health Association: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA).

Para o isolamento e identificação de *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Vibrio sp.*, as amostras foram submetidas a enriquecimento em Água peptonada alcalina (APA), contendo 1% de cloreto de sódio (NaCl) e incubadas a 37°C, por 18 a 24 horas. Em seguida, foi realizada a semeadura em Ágar de Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose (TCBS), seletivo para o isolamento e o cultivo de bactérias do gênero *Vibrio*; e ágar de glutamato amido vermelho de fenol, seletivo para bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Posteriormente, foi realizada a incubação a 37°C *overnight* (APHA, 2001).

As colônias suspeitas, fermentadoras ou não de sacarose, foram repicadas para os meios de triagem em Ágar de ferro de Kligler e Ágar de ferro lisina e no Ágar Nutriente, acrescido de 1% de NaCl. Em seguida, foram selecionadas as cepas citocromo-oxidase positivas e realizados os seguintes testes bioquímicos: resistência ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino-6, 7 diisopril-pteridina), produção de ONPG (Orto- nitrofenil-β-D- galactosidase), produção de acetoína em meio Voges-Proskauer, testes de halofilia, fermentação da glicose, lactose, sacarose, arabinose, manitol e esculina e utilização dos aminoácidos lisina e ornitina descarboxilase e arginina desidrolase, visando a identificação das bactérias das famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae* (APHA, 2001).

Para a identificação de *Enterobacteriaceae*, as amostras foram semeadas em meios de enriquecimento: Caldo Nutriente e Tetracionato Muller-Kauffmann, ambos incubados a 37°C por 18 a 24 horas; e Rappaport-Vassiliadis, incubado a 42°C *overnight*. Em seguida, realizou-se o isolamento no meio Ágar Entérico Hektoen e no meio Eosina azul de metileno (EAM) a 37°C por 18 a 24 horas (APHA, 2001).

As colônias suspeitas, fermentadoras ou não de lactose, foram repicadas para o meio de triagem Costa & Vernin (CV), para o isolamento e identificação das espécies os seguintes testes bioquímicos foram realizados: descarboxilação do aminoácido lisina, capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono, e pela mobilidade, produção de sulfeto de hidrogênio e indol em meio SIM, fermentação da glicose, lactose, sacarose, arabinose e manitol, hidrólise da ureia e utilização dos aminoácidos lisina e ornitina descarboxilase e arginina desidrolase (APHA, 2001).

Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados sob uma matriz de presença ou ausência de bactérias entéricas presentes entre as espécies de tubarões e raias capturadas no Golfão Maranhense. Foi realizada uma análise do percentual de bactérias associadas aos de tubarões e raias capturados, considerando a presença de bactérias em cada indivíduo de elasmobrânquio analisado a partir da sentença matemática:

$$P\% = B/N, \text{ onde}$$

P% - Percentual de espécies de bactérias presentes no total de tubarões e raias;

B – Presença da espécie de bactéria em cada indivíduo de Elasmobrânquio;

N- Número total de indivíduos de Elasmobrânquios analisados.

Uma análise da frequência de ocorrência das bactérias entéricas também foi realizada para cada uma das espécies de tubarões e raias estudadas, a partir dos dados de presença e ausência, utilizando a sentença matemática:

$$FO = B/N \times 100, \text{ onde}$$

FO – Frequência de ocorrência;

B - Presença da espécie de bactéria em cada espécie;

N – Número total de indivíduos de cada espécie.

Os intervalos de frequência propostos por Bodin (1977) foram aplicados, os grupos constantes ($\geq 76\%$), os grupos muito frequentes (51% - 75%), os grupos comuns (26% - 50%) e os grupos raros ($\leq 25\%$).

RESULTADOS

Os Elasmobrânquios analisados apresentaram tamanhos variados, as raias variaram de 30,23-77,4 cm de largura de disco, os tubarões tiveram seu comprimento total variando de 33-68,3 cm e a raia *P. pristis* apresentou o comprimento 151,0 cm. A microbiota bacteriana encontrada associada às cavidades entéricas dos Elasmobrânquios foi composta por 17 taxa (Tabela 1).

As bactérias entéricas mais frequentes nos Elasmobrânquios analisados foram *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* e *Serratia* sp, respectivamente com 47%, 38%, 22% e 13% e constituindo nos grupos dominantes. Por outro lado, *Plesionomas shigelloides* V.

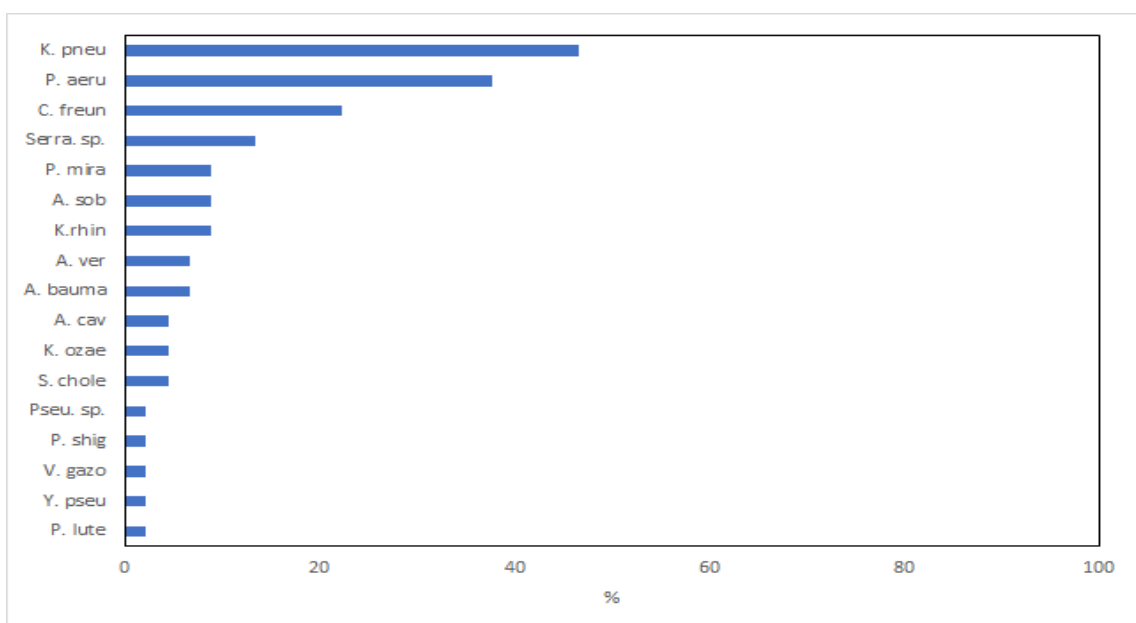
gazogenes, *Yersinia pseudotuberculosis* foram consideradas raras entre as espécies de Elasmobrânquios (Figura 2).

A espécie *H. guttatus* foi a que apresentou a maior riqueza de bactérias associadas, sendo possível a identificação de 13 espécies, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* e *Serratia* sp sendo as espécies com maior frequência de ocorrência. A raia *Rhinoptera bonasus* apresentou apenas 6 espécies de bactérias entéricas associadas, e o tubarão *Carcharhinus porosus* 5, ambas as espécies apresentaram *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* como as bactérias com maior frequência de ocorrência. As demais espécies de Elasmobrânquios tiveram na composição da microbiota entérica variando entre uma a três espécies de bactérias (Figura 3).

Tabela 1- Composição da fauna bacteriana entérica de Elasmobrânquios

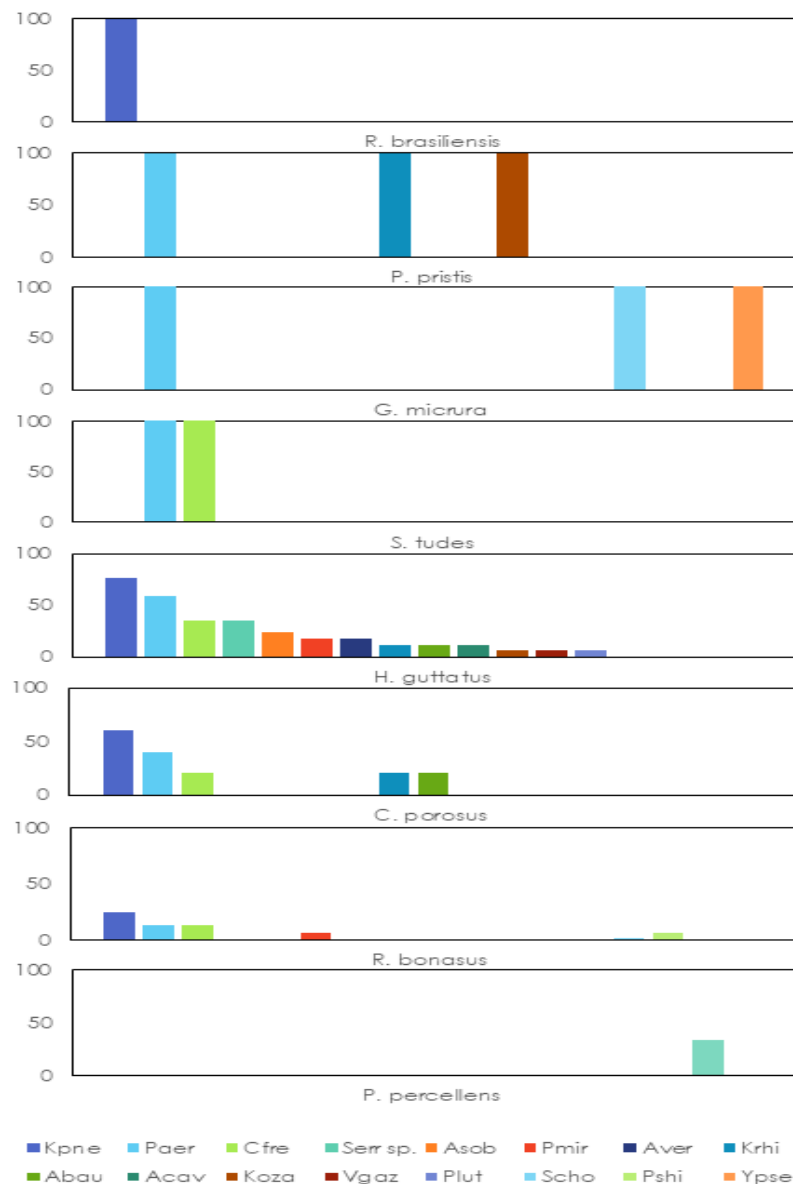
Famílias	Gênero/ Espécie
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp., <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>P. shigelloides</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Vibrionaceae	<i>V. gazogenes</i>
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. luteola</i>
Aeromonadaceae	<i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. veronii</i>
Moraxellaceae	<i>A. baumannii</i>

Figura 2 – Percentual de ocorrência das espécies de bactérias presentes no total de tubarões e raias capturadas no Golfão Maranhense, Litoral Amazônico Brasileiro.



Legenda: **K. pneu:** *Klebsiella pneumoniae*; **P. aeru:** *Pseudomonas aeruginosa*; **C. freun:** *Citrobacter freundii*; **Serra. sp.:** *Serratia* sp.; **P. mira:** *Proteus mirabilis*; **A. sob:** *Aeromonas sobria*; **K. rhin:** *Klebsiella rhinoscleromatis*; **A. ver:** *Aeromonas veronii*; **A. bauma:** *Acinetobacter baumannii*; **A. cav:** *Aeromonas cavie*; **K. ozae:** *Klebsiella ozaenae*; **S. chole:** *Salmonella choleraesuis*; **Pseu. sp.:** *Pseudomonas* sp.; **P. shig:** *Plesionomas shigelloides*; **V. gazo:** *Vibrio gazogenes*; **Y. pseu:** *Yersinia pseudotuberculosis*; **P. lute:** *Pseudomonas luteola*.

Figura 3 – Frequência de ocorrência de bactérias entéricas em tubarões e raias capturadas no Golfão Maranhense, Litoral Amazônico Brasileiro.



Legenda: **Kpne:** *Klebsiella pneumoniae*; **Paer:** *Pseudomonas aeruginosa*; **Cfre:** *Citrobacter freundii*; **Serr sp.:** *Serratia* sp.; **Asob:** *Aeromonas sobria*; **Pmir:** *Proteus mirabilis*; **Aver:** *Aeromonas veronii*; **Krhi:** *Klebsiella rhinoscleromatis*; **Abau:** *Acinetobacter baumannii*; **Acav:** *Aeromonas cavie*; **Koza:** *Klebsiella ozaenae*; **Vgaz:** *Vibrio gazogenes*; **Plut:** *Pseudomonas luteola*; **Scho:** *Salmonella choleraesuis*; **Pshi:** *Plesionomas shigelloides*; **Ypse:** *Yersinia pseudotuberculosis*.

DISCUSSÃO

As bactérias entéricas encontradas no presente estudo pertencem às famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae e Moraxelaceae (Tab 1). Dados semelhantes foram encontrados por Juste-Poinapen et al (2019), onde a microbiota intestinal de tubarões-martelo (*Sphyrna lewini*) mostrou uma comunidade de bactérias diversa, incluindo membros das famílias Enterobacteraceae, Vibrionaceae e Aeromonadaceae. Johny et al (2018), ao realizarem a caracterização da microbiota intestinal do tubarão *Centroscyllium fabricii*, encontraram uma microbiota diferenciada da presente pesquisa, destacando-se os seguintes gêneros (*Acinetobacter sp.*, *Alteromonas sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudonocardia sp.*, *Leeuwenhoekiella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, e *Talassobacillus sp.*). Segundo Juste-Poinapen et al (2019), os microrganismos identificados no presente estudo são conhecidos como habitantes intestinais de espécies de vertebrados marinhos e terrestres, incluindo humanos; e muitos desses microrganismos são considerados patógenos oportunistas.

As bactérias *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *C. freundii* foram as mais frequentes entre os elasmobrânquios da presente pesquisa, dominando a microbiota entérica das espécies *H. guttatus*, *R. bonasus* e *C. porosus*. A *Klebsiella pneumoniae* é prevalente no ambiente marinho costeiro (HÅKONSHOLM et al., 2020), associada a vários tipos de infecções em humanos e animais, e encontrada normalmente em superfícies mucosas, como a cavidade oral, nasal e gastrointestinal (CLEGG; MURPHY, 2016; SOTO et al., 2017; WHITAKER et al., 2018).

Outro fato preocupante sobre essa espécie de bactéria condiz com a escassez de antibióticos eficientes (HÅKONSHOLM et al., 2020). Além disso, *K. pneumoniae* é considerada um dos patógenos oportunistas mais importantes envolvidos na disseminação da resistência antimicrobiana, devido esse microrganismo ser resistente a maioria dos antibióticos existentes, e por esse motivo é considerado uma superbactéria (WYRES; HOLT, 2018).

Klebsiella spp. são bactérias encontradas no ambiente clínico (HÅKONSHOLM et al., 2020), logo, quando esses micro-organismos são detectados fora desse ambiente, provavelmente a sua presença está ligada à contaminação ambiental. Atualmente essas bactérias encontram-se amplamente distribuídas no solo, plantas e águas superficiais (HÅKONSHOLM et al., 2020). E quando são identificadas no ambiente marinho ou associadas aos organismos aquáticos há forte indício que ocorreu contaminação por lixo hospitalar. De acordo com Araújo et al. (2021), ações antrópicas têm promovido uma grande entrada de compostos orgânicos nos ecossistemas costeiros brasileiros. A contaminação dos mares por esgoto doméstico influencia diretamente na comunidade microbiana intestinal dos peixes, incluindo Elasmobrânquios, por

que esses animais podem se alimentar de presas contaminadas com esses dejetos domésticos (JUSTE- POINAPEN et al., 2019).

A bactéria *P. aeruginosa* é um agente patogênico que em alguns casos, pode afetar seu hospedeiro (FELIATRA et al., 2019). Também possui como característica seu comportamento oportunista e está associada à septicemia em organismos aquáticos (MASTAN, 2013; THOMAS et al, 2014; LAMARI; CHAKROUN; RTIMI, 2017).

Citrobacter freundii também é considerada um patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais em animais marinhos, e frequentemente está associado à resistência a diversos antibióticos (FENG et al., 2015; IZDEBSKI et al., 2015; GOLDBERG et al, 2019). Um estudo mostrou preocupação acerca das implicações clínicas e ambientais dessa espécie de bactéria associada ao homem encontrada em ecossistemas marinhos (GOLDBERG et al., 2019).

O descarte de resíduos orgânicos é de grande importância para a saúde pública, pois as águas residuais podem ser um reservatório e veículo de transmissão de bactérias patogênicas (ROBINSON et al., 2016; FRESIA et al., 2019). Esse fato é preocupante no que diz respeito aos Elasmobrânquios, pois segundo com Landrigan et al. (2020), descargas industriais, resíduos farmacêuticos, pesticidas e esgoto contribuem para o declínio global dos estoques de peixes.

Salienta-se que as bactérias *A. cavie.* *A. sobria*, *A. veronii*, *V. gazogenes*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *P. luteola*, *A. baumannii*, *Klebsiella sp.*, *citrobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Plesionomas sp.* e *Yersinia sp.*, não haviam sido previamente identificadas em peixes cartilagosos.

Ressalta-se que *P. shigelloides* e *Y. pseudotuberculosis* foram as menos frequentes nas espécies de elasmobrânquios. Os autores Janda, Abbott e McIver (2016), relatam que o principal *habitat* de *P. shigelloides* é o ecossistema aquático (água doce e estuarina), bem como os organismos desse ambiente (peixes, moluscos, crustáceos, aves aquáticas, mamíferos marinhos, anfíbios e répteis). De acordo Eskova, Yakovlev e Kim (2021), *Y. pseudotuberculosis* é uma bactéria comum no meio ambiente, podendo ser encontrada nas plantas, no solo e na água, ela pode ser introduzida no ambiente marinho por enchentes e águas subterrâneas ou poluição da água de esgoto, que representa um potencial perigo para a população.

As espécies com maior número amostral como as raias *H. guttatus* e *R. bonasus* podem refletir sua maior frequência na localidade aonde foram capturadas. A maioria dos registros ictiofaunísticos realizados nas regiões Norte e Nordeste, menciona *H. guttatus* como a mais abundante nessas regiões (GOMES et al., 2019). Coelho, Nunes e Nunes (2019), reforçam que essas duas espécies são as mais frequentes no estado do Maranhão. Essas espécies de raias são

consideradas um importante alvo da pesca artesanal no estado (NUNES; ALMEIDA; PIORSKI, 2005; COELHO; NUNES; NUNES, 2019), sendo *H. guttatus* na América Latina e no extremo sul da costa amazônica brasileira (PEGADO et al., 2020)

A raia *H. guttatus* habita águas rasas, tropicais e subtropicais, até cerca de 35m de profundidade (GOMES et al., 2019), é considerada um importante predador de organismos bentônicos e bentopelágicos costeiros, alimentando-se de uma grande variedade de presas (GIANETI et al., 2019), incluindo crustáceos, poliquetas e moluscos (GOMES et al., 2019), já a *R. bonasus* é uma espécie costeira, de hábitos bentônicos e pelágicos que possuem uma dieta à base de moluscos de conchas duras e crustáceos (GOMES et al., 2019).

A espécie *C. porosus* é encontrada sobre a plataforma continental em águas tropicais, vive preferencialmente próxima ao fundo lamoso de regiões estuarinas, a profundidades de até 80 m, e alimenta-se de crustáceos, pequenos peixes ósseos e, eventualmente, neonatos de tubarões (GOMES et al., 2019).

A ecologia alimentar e o modo de vida dos animais podem explicar a diversidade da microbiota entérica encontrada nas três espécies estudadas. Pois, os hábitos de vida dos animais como dieta alimentar e o *habitat* são características que também influenciam na composição da microbiota associada (STORO et al., 2021). Essa diversidade de micro-organismos pode contribuir ainda mais para a redução das populações de *H. guttatus*, *R. bonasus* e *C. porosus*, salienta-se que esses animais estão classificados na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) como “quase ameaçada”, “vulnerável” e “criticamente ameaçada”, respectivamente.

Segundo Santana, Feitosa e Lessa (2020), *C. porosus* sofreu uma redução considerável nas capturas, possivelmente devido ao declínio de sua população. Tal fato justifica o número pequeno da coleta de amostras (5). Ainda assim os dados mostraram uma microbiota variada, pois foram isoladas bactérias de todas as amostras, com a identificação de cinco espécies bacterianas (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *A. Baumannii* e *K. rhinoschleromatis*).

A espécie *C. porosus* é pelágica e demersal, habita desde águas rasas até profundas (GOMES et al., 2019). Entende-se que ao se moverem para águas mais rasas os animais estarão propensos a uma maior influência da contaminação ambiental, pois estarão sujeitos aos impactos costeiros. Segundo Storo et al. (2021), a frequência desse comportamento pode contribuir para a composição geral da comunidade do microbioma dos tubarões, pois os fatores ambientais podem mudar com a profundidade da água. Ainda de acordo com os autores diferentes espécies de tubarões podem habitar nichos ou exibir comportamentos que podem estar relacionados às comunidades microbianas diferenciadas.

CONCLUSÃO

A microbiota associada a esse grupo de peixes é (i) diversa sendo possível a identificação de bactérias pertencentes a cinco famílias; (ii) os microrganismos prevalentes foram *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*.; (iii) a maioria das bactérias (*A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *V. gazogenes*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *P. luteola*, *A. baumannii*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Plesionomas sp.* e *Yersinia sp*) isoladas e identificadas na microbiota entérica de tubarões e raias do Litoral Amazônico Brasileiro é registrada pela primeira vez em elasmobrânquios.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. et al. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643–661, 2012.
- APHA. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington, 2001.
- APPRILL, A. Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. **Marine Animal Microbiomes**, v. 4, 2017.
- ARAÚJO, M. P. et al. Fecal sterols as sewage contamination indicators in Brazilian mangroves. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, 2021.
- AUSTIN, B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. **The Scientific World Journal**, v. 6, p. 931–945, 2006.
- BINDIYA, E. S. et al. Characterization of Deep Sea Fish Gut Bacteria with Antagonistic Potential, from *Centroscyllium fabricii* (Deep Sea Shark). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 7, n. 2, p. 157–163, 2015.
- BODIN, P. Le peuplements de Copepodes Harpacticoides (Crustacea) des sédiments meubles de la zone interdale des côtes charetoises (Atlantiques). **Mémoires du Muséum National d’Histoire Naturelle, serie A, Zoologies**, v. 104, 1977.
- CASTRO, A. C. L. et al. Physicochemical properties and distribution of nutrients on the inner continental shelf adjacent to the Gulf of Maranhão (Brazil) in the Equatorial Atlantic. **Appl. Ecol. Environ**, v. 16, p. 4829–4847, 2018.
- CARRILLO-BRICEÑO, J. D. et al. Shark and ray diversity in the Tropical America (Neotropics)—an examination of environmental and historical factors affecting diversity. **PeerJ**, v. 6, n. 5313, 2018.
- CLEGG, S., MURPHY, C.N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol. Spectr**, v. 4, p. 1–17, 2016.
- COELHO, K. K. F; NUNES, A. R. O. P; NUNES, J. L. S. Conhecimento ecológico local como ferramenta para conservação da condrofauna em municípios do maranhão. In:

INTERNATIONAL MEETING ON AMAZONIAN SHARKS AND BATOIDS, 1, 2019, São Luís. **Anais...**São Luís, UFMA, 2019.

DAVIDSON, L. N. K.; KRAWCHUK, M. A.; DULVY, N. K. Why have global shark and ray landings declined : improved management or over fishing ?. **Fish and Fisheries**, p. 1–21, 2015.

DOANE, M. P. et al. The skin microbiome of the common thresher shark (*Alopias vulpinus*) has low taxonomic and gene function β -diversity. **Environmental Microbiology Reports**, v. 9, n. 4, p. 357–373, 2017.

DULVY, N. K. et al. Extinction risk and conservation of the world 's sharks and rays. **Elife**, 2014.

ESKOVA, A. I.; YAKOVLEV, A. A.; KIM, A. V. Modeling of Interspecific Interaction of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Listeria monocytogenes* in a Mixed-Species Biofilms with Microorganisms Isolated from Coastal Waters of the Sea of Japan. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.170, n. 4, 2021.

FEITOSA, L. M. et al. DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

FELIATRA, F. et al. Sensitivity of Heterotrophic Bacteria in the Low-Salinity Water Areas and Estuary in Siak District toward Pathogenic Bacteria in Fish. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

FENG, J. et al. Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and na NDM-1-encoding pNDM-HN380-like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 2987–2991, 2015.

FRESIA, P. et al. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. **Microbiome**, v. 7, n. 35, p. 1–9, 2019.

GIANETI, M. D. et al. Diet of longnose stingray *Hypanus guttatus* (Myliobatiformes: Dasyatidae) in tropical coastal waters of Brazil. **J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom**, v. 99, p. 1869–1877, 2019.

GOLDBERG, D. W. Genetic background of CTX-M-15-producing *Enterobacter hormaechei* ST114 and *Citrobacter freundii* ST265 co-infecting a free-living green turtle (*Chelonia mydas*). **Zoonoses Public Health**, p. 1-6, 2019.

GOMES, U. L. et al. Guia para identificação dos tubarões, raias e quimeras do estado rio de janeiro (chondrichthyes: elasmobranchii e holocephali). **Revista Nordestina de Biologia**, v. 27, n. 1, p. 2236-1480, 2019.

GONÇALVES E SILVA, F. et al. Skin and stinger bacterial communities in two critically endangered rays from the South Atlantic in natural and aquarium settings. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2020.

HÅKONSHOLM, F. et al. Antibiotic Sensitivity Screening of *Klebsiella* spp. and *Raoultella* spp. Isolated from Marine Bivalve Molluscs Reveal Presence of CTX-M-Producing *K. pneumoniae*. **Microorganisms**, v. 8, n. 1909, 2020.

- HAYATA, M. A.; BORNATOWSKI, H.; FREITAS, R. H. A. Patterns and partitioning of food resources by elasmobranchs in southern Brazil. **Environ Biol Fish**, v. 104, p. 437–450, 2021.
- IZDEBSKI, R. et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 48–56, 2015.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.; MCIVER, C. J. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 349–374, 2016.
- JOHNY, T. K. et al. Metabarcoding data of bacterial diversity of the deep sea shark, *Centroscyllium fabricii*. **Data in Brief**, v. 21, p. 1029–1032, 2018.
- JUSTE-POINAPEN, N. M. S. et al. Community profiling of the intestinal microbial community of juvenile Hammerhead Sharks (*Sphyrna lewini*) from the Rewa Delta, Fiji. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- LAMARI, F.; CHAKROUN, I.; RTIMI, S. Assessment of the correlation among antibiotic resistance, adherence to abiotic and biotic surfaces, invasion and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diseased gilthead sea bream. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2017.
- LANDRIGAN, P. J. Human Health and Ocean Pollution. **Annals of Global Health**, v. 86, n. 1, p. 1–64, 2020.
- MASTAN, S. A. *Pseudomonas* septicemia in *Labeo rohita* (HAM) and *Cyprinus carpio* (LINN) in andhra pradesh-natural occurrence and artificial challenge. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 564-568, 2013.
- MARTINS, A. P. B. et al. Analysis of the supply chain and conservation status of sharks (Elasmobranchii: Superorder Selachimorpha) based on fisher knowledge. **PLoS One**, v. 13, n. 3, 2018.
- NUNES, J. L. S.; ALMEIDA, Z. Da S.; PIORSKI, N. M. Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão – Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 38, p. 49-54, 2005.
- OLAFSEN, J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. **Aquaculture**, v. 200, p. 223–247, 2001.
- PACOUREAU, N. et al. Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. **Nature**, v. 589, 2021.
- PEGADO, T. et al. Ingestion of microplastics by *Hypanus guttatus* stingrays in the Western Atlantic Ocean (Brazilian Amazon Coast). **Marine Pollution Bulletin**, 2020.
- POGOREUTZ, C. et al. Similar bacterial communities on healthy and injured skin of black tip reef sharks. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1–16, 2019.
- RANGEL, B. S. et al. Brazil can protect sharks worldwide. **Science**, v. 373, p. 633-633, 2021.

- ROBINSON, T. P. et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 377–380, 2016.
- RODRIGUES FILHO, L. F. S. et al. Molecular identification of ray species traded along the Brazilian Amazon coast. **Fisheries Research**, v. 223, 2020.
- SANTANA, F. M.; FEITOSA, L. M.; LESSA, R. P. From plentiful to critically endangered: Demographic evidence of the artisanal fisheries impact on the smalltail shark (*Carcharhinus porosus*) from Northern Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 18, 2020.
- SOTO, E. et al. Biofilm formation of hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* recovered from clinically affected African green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). **Microb. Pathog.** V. 107, p. 198–201, 2017.
- SOUZA FILHO, P. W. M. Costa de manguezais de macromaré da amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Rev. Bras. Geofis.** v. 23, p. 427–435, 2005.
- TAO, Z.; BULLARD, S. A.; ARIAS, C. R. Diversity of bacteria cultured from the blood of lesser electric rays caught in the northern gulf of Mexico. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 26, n. 4, p. 225–232, 2014.
- TEIXEIRA, S.G.; SOUZA FILHO, P. W. M. Mapeamento de ambientes costeiros tropicais (Golfão Maranhense, Brasil) utilizando imagens de sensores remotos orbitais. **Rev. Bras. Geofis.** v. 27, p. 69–82, p. 2009.
- THOMAS, J. et al. Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 372–377, 2014.
- UNGER, N. R. et al. Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated within the oral flora of Florida blacktip sharks: Guidance for empiric antibiotic therapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- WARD, J. R.; LAFFERTY, K. D. The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing?. **PLoS Biology**, v. 2, n. 4, p. 542–547, 2004.
- WHITAKER, D.M. et al. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates from stranded and wild-caught marine mammals of the us pacific coast: prevalence, phenotype, and genotype. **J. Wildl. Dis.** v. 54, p. 659–670, 2018.
- WOSNICK, N. et al. Negative metal bioaccumulation impacts on systemic shark health and homeostatic balance. **Marine pollution bulletin**, v. 168, p. 112398, 2021.
- WOSNICK, N. et al. Nurse sharks, space rockets and cargo ships: Metals and oxidative stress in a benthic, resident and large-sized mesopredator, *Ginglymostoma cirratum*. **Environmental pollution**, v. 288, p. 117784, 2021.
- WYRES, K. L.; HOLT, K. E. ScienceDirect *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131–139, 2018.

CAPÍTULO III

PRESENÇA DE FUNGOS EM ELASMOBRÂNQUIOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL

Ivana Correia Costa¹, Kátia Regina Assunção Borges², Salvatore Siciliano³, Jorge Luiz Silva
Nunes¹

¹ Laboratório de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Maranhão, São Luís-
Maranhão, Brasil

² Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal
do Maranhão, São Luís- Maranhão, Brasil

³ Laboratório de Biodiversidade, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Tubarões e raias são consumidos no Brasil e, como todos os alimentos de origem marinha são altamente perecíveis, necessitando de certos cuidados durante a cadeia produtiva como manuseio correto, ser acondicionado em temperatura ideal e exposição em ambiente dentro dos padrões sanitários para manter a qualidade do produto e não gerar prejuízos à saúde do consumidor. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi conhecer a microbiota fúngica presente em amostras de elasmobrânquios comercializados em São Luís, Maranhão. Os gêneros de fungos filamentosos isolados foram identificados pela taxonomia clássica, e os fungos leveduriformes pelo método automatizado VITEK[®] BioMérieux. Os fungos mais frequentes entre os elasmobrânquios foram *Aspergillus* seção *nigri* (80%), *Fusarium* sp. (40%) e *Scopulariopsis* sp. (40%), além desses, outros fungos também foram identificados, *Aspergillus* seção *flavi.*, *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Penicilium* sp., *Sporothrix* sp., e duas espécies de levedura. Vários gêneros de fungos têm sido descritos como contaminantes desse tipo de alimento, incluindo potenciais produtores de micotoxinas, como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Além dos fungos toxigênicos identificados na presente pesquisa, outros fungos associados às micoses cutâneas, subcutâneas e sistêmicas em humanos também foram isolados (*Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *C. parapsilosis* e *C. haemulonii*).

Palavras-chave: Microbiologia de alimentos. Peixes. Contaminação de alimentos. Segurança alimentar.

INTRODUÇÃO

O Brasil figura entre os principais países pesqueiros de elasmobrânquios, além de maior importador de carne de tubarão do mundo, e conseqüentemente o maior consumidor desse alimento (BARRETO et al., 2017; DULVY et al, 2017). O consumo dessa categoria de peixe

se dá devido ao seu valor nutricional, constituindo fonte natural de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser indicado para pessoas de qualquer faixa etária. Entretanto, esse alimento apresenta grande susceptibilidade a degeneração, principalmente pela sua composição química, fator primordial para a proliferação de microrganismos (MACENA et al, 2017).

Esses microrganismos são comumente isolados de alimentos e por esse motivo podem ser usados como parâmetro na avaliação microbiológica, determinando as condições higiênicas sanitárias do peixe comercializado, pois são utilizados como indicadores da qualidade higiênica (CALVET et al., 2012).

Vale ressaltar, que assim como as bactérias, a investigação de fungos é de suma importância pois podem propiciar alterações no odor e sabor dos alimentos, causando diferentes graus de deterioração através de uma contaminação cruzada acarretando perigo a saúde humana principalmente pela produção de micotoxinas (NUNES et al., 2013; OLIVEIRA; OLIVEIRA; MENEGHELLO, 2013; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016).

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas durante o metabolismo do fungo no processo de decomposição dos alimentos (KUBITZA, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2019). Entre elas, as aflatoxinas causam efeitos hepatotóxicos, nefrotóxico e carcinogênico (GOPINATH; RAJ, 2009). Além dessas, outras toxinas como ocratoxina, citrinina, zearalenona causam danos em animais e humanos e, portanto, são de importância para a saúde pública (DE OLIVEIRA et al, 2019).

Os gêneros de fungos filamentosos que comumente produzem toxinas são *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (KIM et al., 2020). A contaminação fúngica e síntese de micotoxinas podem ocorrer no transporte, processamento e armazenamento de um determinado alimento (FLORES-FLORES et al., 2015).

Algumas micotoxinas suportam altas temperaturas (150 °C) e são resistentes ao frio, além de serem incolores, inodoras e não alterarem o sabor dos alimentos (CHANNIAH, 2019). Essas características permitem que esses metabólitos persistam no alimento mesmo após sofrerem os processos usuais de industrialização (PANKAJ; SHI; KEENER, 2018). Desta forma, a presença de micotoxinas em músculo de peixe pode estar relacionado à transferência vertical na cadeia produtiva, em alguns casos da matéria-prima até a produção de ração e dela para o peixe (MICHELIN et al., 2016).

A Organização Mundial de Saúde Animal estabelece métodos diagnósticos e recomenda amostragem para fins de vigilância sanitária de animais aquáticos levados ao mercado, para reduzir o risco de contaminação. A adesão a esses procedimentos garante a avaliação periódica

da qualidade microbiológica do produto, bem como a segurança à saúde do consumidor (LAURIN et al., 2019). No entanto, a investigação da presença de fungos em peixes frescos ainda é restrita na literatura.

A maioria dos trabalhos com a microbiota de elasmobrânquios, está direcionada para a identificação de bactérias (CROW; BROCK; KAISER, 1995; MYLNICZENKO et al., 2007; FERREIRA et al, 2014; DOS REIS et al, 2017; EVANGELISTA- BARRETO et al., 2017; POGOREUTZ et al., 2019; DE MAGALHÃES et al., 2020). No entanto, poucos relatos sobre a microbiota fúngica nesse grupo de peixes apontam a presença de *Fusarium solani*, *Dasyatispora levantinae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Mucor circinelloides*, *Exophiala pisciphila*, *Exophiala* sp, *Fusarium keratoplasticum* e *Metarhizium robertsii* (DIAMANT et al., 2010; MARANCIK et al., 2011; FERNANDO et al., 2015; ERLACHER-REID et al., 2016; DESOUBEAUX et al., 2018).

A presença desses fungos nesse tipo de alimento configura um alto risco de intoxicação alimentar devido à alta capacidade de produzir micotoxinas. No Brasil, não há regulamentação que determina padrões mínimos para a presença de fungos em peixes, assim como existem para algumas espécies de bactérias (e.g. *Escherichia coli*). Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar a microbiota fúngica em amostras de tubarões e raias comercializados em São Luís.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas cinco amostras de peixes cartilaginosos entre tubarões e raias, sendo: duas de raia prego *Hypanus berthaltutzae*, uma da raia jamburana *Rhinoptera bonasus*, uma do cação-junteiro *Carcharhinus porosus* e uma do tubarão martelo *Sphyrna tudes*, obtidas em mercados e supermercadados da cidade de São Luís, Maranhão.

Isolamento de fungos filamentosos e leveduras

Uma amostra de tecido muscular de 25 g de cada espécie de raia ou tubarão foi homogeneizada em 225ml de água peptonada correspondendo à primeira diluição, a partir dessa foram realizadas as diluições seriadas decimais 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ; foram consideradas para análise apenas as duas últimas diluições. Assim, uma alíquota de cada diluição foi transferida para as placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud, seis placas de Petri para cada diluição foram usadas e incubadas em temperatura de 25°C (3 placas de cada diluição) e 37°C (3 placas de cada diluição) por 24h (DE HOOG; GUARRO; GENE, 2001). Após o período de crescimento, as colônias foram isoladas em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura da sementeira (Ágar Sabouraud), novamente foram incubadas para crescimento respeitando a

temperatura inicial a fim de se obter colônias puras. Posteriormente realizou-se a taxonomia clássica para a identificação dos gêneros de fungos filamentosos isolados (DE HOOG; GUARRO; GENE, 2001; NUNES et al., 2015), enquanto os fungos leveduriformes foram identificados pelo método automatizado VITEK® BioMérieux (RODRIGUES et al., 2019).

Análise dos dados

Foi realizada uma análise do percentual de fungos associadas aos elasmobrânquios comercializados, considerando a presença de fungo em cada indivíduo analisado a partir da sentença matemática:

$$P\% = B/N, \text{ onde}$$

P% - Percentual de fungos presentes no total de tubarões e raias;

B – Presença de fungo em cada indivíduo de Elasmobrânquio;

N- Número total de indivíduos de Elasmobrânquios analisados.

Uma análise da frequência de ocorrência dos fungos também foi realizada para cada uma das espécies de elasmobrânquios estudadas, a partir dos dados de presença e ausência, utilizando a sentença matemática:

$$FO = B/N \times 100, \text{ onde}$$

FO – Frequência de ocorrência;

B - Presença de fungo em cada espécie;

N – Número total de indivíduos de cada espécie.

RESULTADOS

Houve crescimento de fungos em todas as amostras, sendo identificados oito gêneros de fungos filamentosos e duas espécies de leveduras. No primeiro grupo encontrou-se *Aspergillus* seção *flavi*, *Aspergillus* seção *nigri*, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., e *Sporothrix* sp. e no segundo *Candida parapsilosis* e *Candida haemulonii* (Tabela 1).

Os fungos mais frequentes nas amostras de elasmobrânquios foram *Aspergillus* seção *nigri*, *Fusarium* sp., e *Scopulariopsis* sp., respectivamente com 80%, 40% e 40%. Por outro lado, *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Candida parapsilosis*, *Candida haemulonii* e *Aspergillus* seção *flavi* foram considerados raros entre as espécies de elasmobrânquios (Figura 1).

As espécies de elasmobrânquios que apresentaram o maior número de fungos foram *Sphyrna tudes* e *Hypanus berthaltutzae*. Sendo que para a espécie de tubarão *S. tudes* foi possível a identificação de dois gêneros filamentosos, a saber: *Aspergillus* sp. que se divide em *Aspergillus* seção *nigri* e *flavi*, e *Rhizopus* sp. e ainda duas espécies de leveduras *C. parapsilosis*

e *C. haemulonii*. E para a espécie de raia *H. berthalutzae*, identificou-se quatro gêneros fúngicos, *Aspergillus* seção *nigri*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., e *Sporothrix* sp. (Figura 2).

Os fungos isolados no presente trabalho foram associados aos principais riscos envolvendo a saúde humana descritos pela literatura (Tabela 2).

Tabela 1- Fungos filamentosos e leveduras isolados do músculo (carne) de tubarões e raias comercializados na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

Identificação das amostras	Local de obtenção das amostras	Gêneros/Espécies isoladas de fungo
<i>Hypanus berthalutzae</i>	Supermercado	<i>Aspergillus</i> seção <i>nigri</i> <i>Cladosporium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.
<i>Hypanus berthalutzae</i>	Supermercado	<i>Sporothrix</i> sp.
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Mercado	<i>Aspergillus</i> seção <i>nigri</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> sp.
<i>Carcharhinus porosus</i>	Mercado	<i>Scopulariopsis</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.
<i>Sphyrna tudes</i>	Mercado	<i>Aspergillus</i> seção <i>nigri</i> <i>Aspergillus</i> seção <i>flavi</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida haemulonii</i>

Figura 1- Percentual de fungos presentes no total de elasmobrânquios comercializados em São Luís, Maranhão, Brasil.

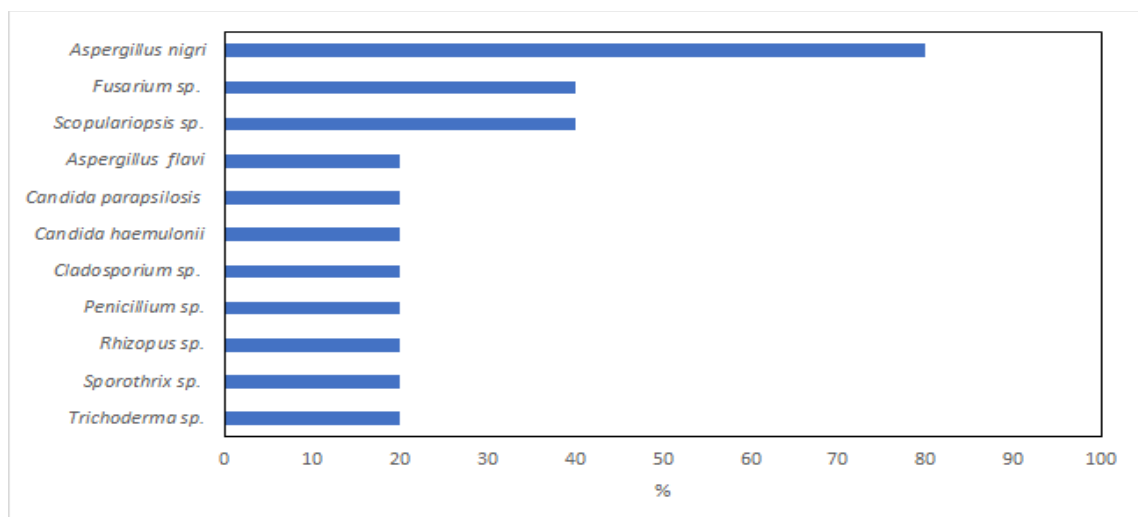
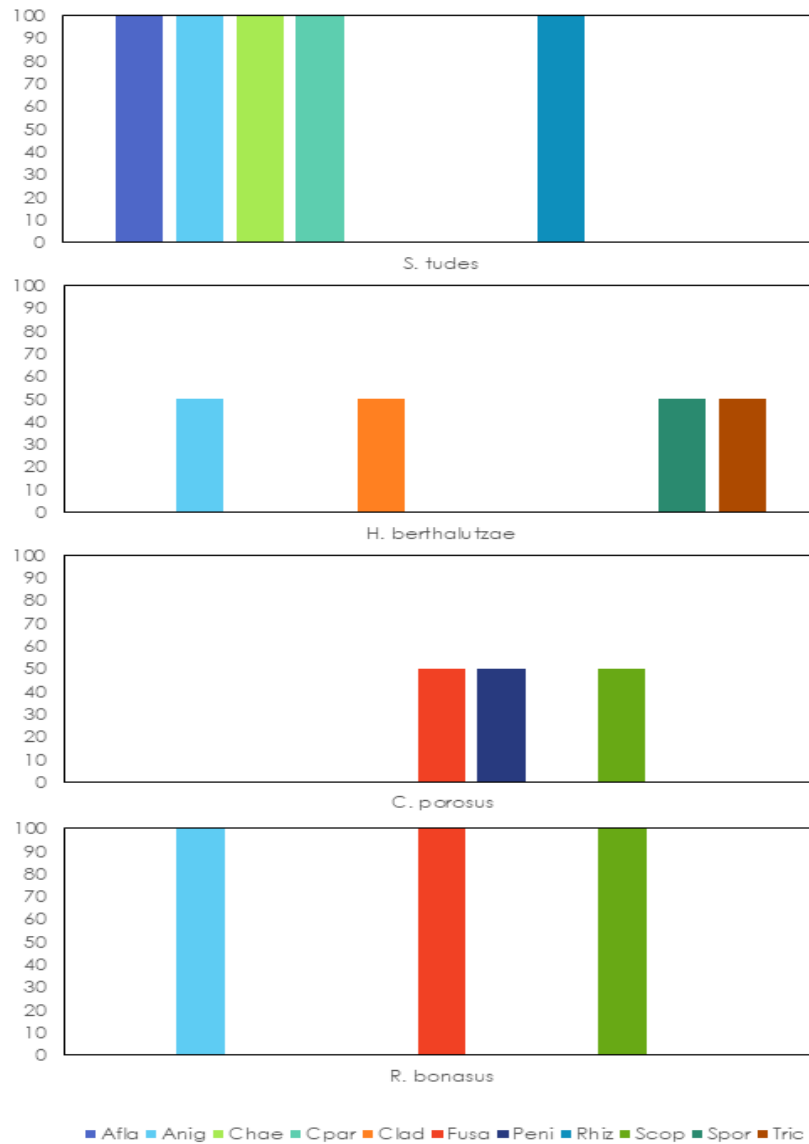


Figura 2- Frequência de ocorrência de fungos em elasmobrânquios comercializados em São Luís, Maranhão, Brasil.



Legenda: **Afla:** *Aspergillus flavi*; **Anig:** *Aspergillus nigri*; **Chae:** *Candida haemulonii*; **Cpar:** *Candida parapsilopsis*; **Clad:** *Cladosporium*; **Fusa:** *Fusarium*; **Peni:** *Penicillium*; **Rhiz:** *Rhizopus*; **Scop:** *Scopulariopsis*; **Spor:** *Sporothrix*; **Tric:** *Trichoderma*.

Figura 3- Macrofotografias de fungos filamentosos e levedura: *Aspergillus* seção *flavi* (A), *Aspergillus* seção *nigri* (B) e *Rhizopus* sp. (C), *Fusarium* sp. (D), *Scopulariopsis* sp. (E), *Penicillium* sp. (F), *Cladosporium* sp. (G), *Trichoderma* sp. (H), *Sporothrix* sp., em sua forma de levedura (I) e *Candida haemulonii* (J), isolados de elasmobrânquios comercializados na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

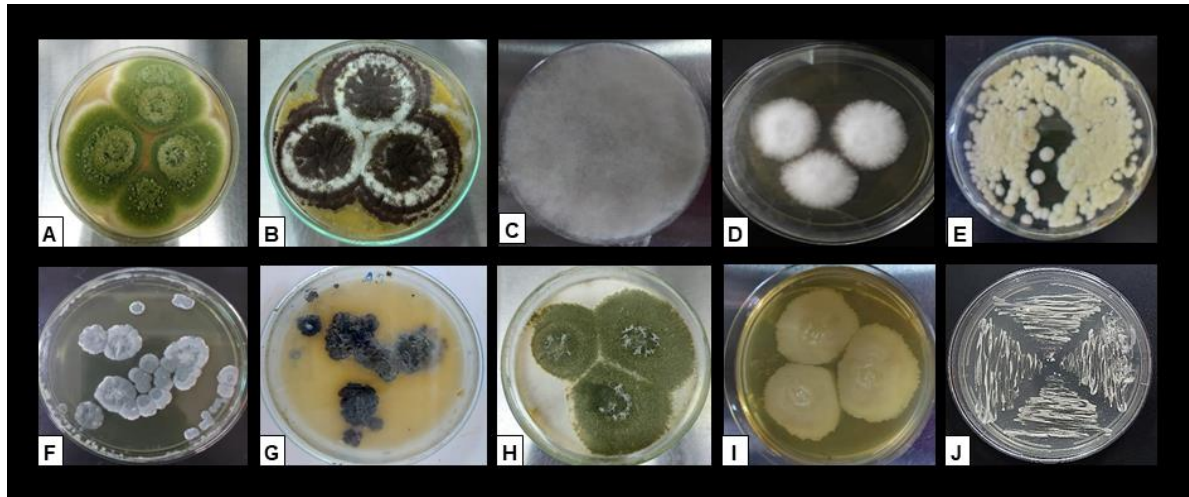


Figura 4- Microfotografias de fungos filamentosos e levedura: *Aspergillus* seção *flavi* (A), *Aspergillus* seção *nigri* (B) e *Rhizopus* sp. (C), *Fusarium* sp. (D), *Scopulariopsis* sp. (E), *Penicillium* sp. (F), *Cladosporium* sp. (G), *Trichoderma* sp. (H), *Sporothrix* sp., em sua forma filamentosa (I) e *Candida haemulonii* (J), isolados de elasmobrânquios comercializados na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil.

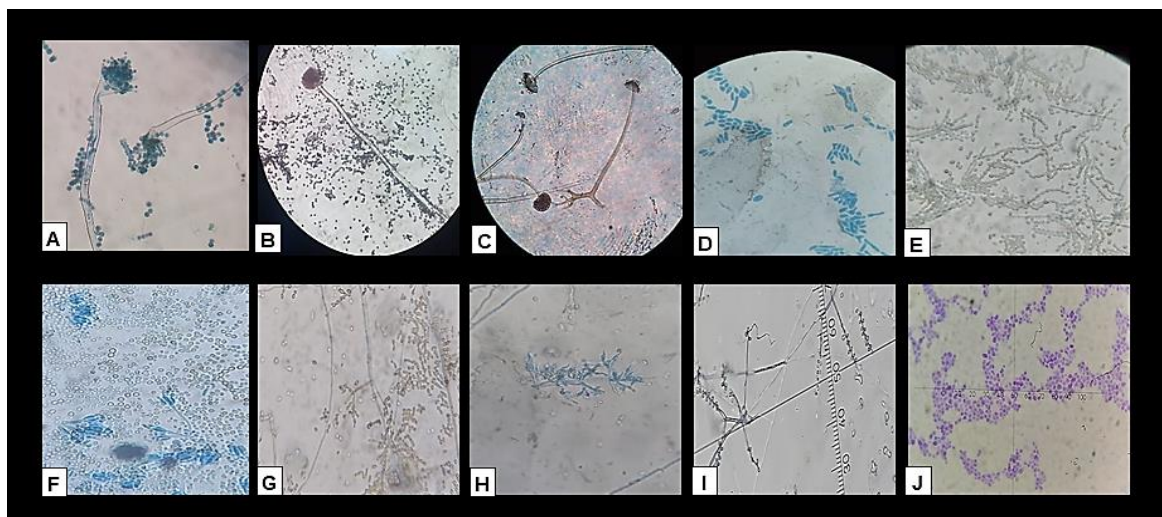


Tabela 2- Distribuição de fungos associados aos riscos à saúde de acordo com a produção de micotoxinas e infecções fúngicas.

Gêneros/espécies de fungos	Principais riscos associados à saúde	Fonte
<i>Aspergillus</i> sp.	Micotoxinas (aflatoxinas- B1, B2, G1 e G2)	RAZZAGHI-ABYANEH; SHAMS-GHAHFAROKHI; CHANG, 2011.
<i>Fusarium</i> sp.	Micotoxinas (fumonisinas, zearalenona, moniliformina, eniáticas, beauvericina); Outros compostos (nivalenol, deoxinivalenol, toxina T-2).	BENNETT; KLICH, 2003; PESTKA, 2007; AFOLABI et al., 2020; MUNAWAR et al., 2019; WITASZAK et al., 2020.
<i>Penicillium</i> sp.	Micotoxinas (ocratoxina A, Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2)	SCHMIDT-HEYDT et al., 2012; PEREIRA et al., 2017.
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Onicomicose, otomicose e pan-oftalmite, micoses cutâneas e infecções sistêmicas	BREGONDE et al, 2020.
<i>Trichoderma</i> sp.	Sinusite invasiva alérgica e aguda, ceratite, otite externa, infecções cutâneas e subcutâneas, peritonite, pulmonares, endocardite e abscesso cerebral,	SANDOVAL-DENIS et al, 2014.
<i>Cladosporium</i> sp.	Infecções de pele, rinossinusite, abscesso cerebral e septicemia	DE MENEZES; PÉREZ; LIMA, 2017; GARCIA et al, 2018; BATRA et al, 2019.
<i>Rhizopus</i> sp.	Sinusite invasiva e Micotoxina (Ocratoxina A)	INGLEY; PARIKH; DELGAUDIO, 2008; PEREIRA et al., 2017.
<i>Sporothrix</i> sp.	Micose- esporotricose	MARIMON et al., 2007; GUSMAO, 2017.
<i>Candida parapsilosis</i>	Infecção do trato urinário, infecção sistêmica	COLOMBO; GUIMARÃES, 2007.
<i>Candida haemulonii</i>	Infecções cutâneas e profundas	COLOMBO; DE ALMEIDA JÚNIOR; GUINEA, 2017.

DISCUSSÃO

De uma forma geral, observou-se a presença de fungos considerados pela literatura como toxigênicos e causadores de doenças infecciosas.

O gênero mais frequente entre os elasmobrânquios foi *Aspergillus* seção *nigri* (80%) (Fig. 1). Esse dado está de acordo com o trabalho de Bernal, Greñas e Pateña (2018), que isolou *Aspergillus niger* em amostras de frutos do mar (lula) e peixe obtidas em mercado público da cidade de Batangas, Filipinas.

Espécies do gênero *Aspergillus* são comuns em produtos alimentícios, e consequentemente tornam-se um risco à saúde do consumidor devido a produção de

micotoxinas (EVANGELISTA- BARRETO et al., 2016). Além disso, essas espécies suportam altas salinidades e dessa forma podem contaminar alimentos de origem marinha como camarão e peixe (YANG et al, 2018; DAS et al, 2019).

O gênero *Fusarium* sp. também se destacou no presente estudo, obtendo 40% de predominância entre as amostras. Resultados semelhantes foram encontrados por Fernando et al. (2015); Pirarat et al. (2016) e Desoubeaux et al. (2018), os autores identificaram o fungo *Fusarium solani* como parte da microbiota de raias e tubarões. De Freitas et al. (2021), relataram que *Fusarium* sp. se destacou em amostras de camarão salgado comercializado no município de Rio Branco, Acre, e que a frequência do fungo encontrada nas amostras foi de 16,67%.

O fungo *Scopulariopsis* sp., obteve 40% de prevalência entre as amostras. Esse achado está de acordo com Elbanna et al. (2019), onde foi isolado o mesmo gênero fúngico de uma tainha (*Mugil*) na Austrália.

Dois espécies de levedura *C. parapsilosis* e *C. haemulonii*, foram identificadas no presente trabalho. Desta forma, nossos resultados se assemelham aos de Macena et al. (2017), onde os autores detectaram leveduras em peixes *in natura* comercializados no mercado municipal de Teixeira de Freitas na Bahia.

A espécie de elasmobrânquio que apresentou a maior riqueza de fungos associados foi o tubarão *Sphyrna tudes*. Salienta que essa espécie e o *Carcharhinus porosus* estão criticamente ameaçadas de extinção, e são comercializadas normalmente no mercado local.

Salienta-se que a maioria dos fungos identificados no presente trabalho (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *Rhizopus* sp. *C. parapsilosis* e *C. haemulonii*) foram isolados pela primeira vez em tubarões e raias.

Considerando que esses fungos estão presentes no ambiente e são transmitidos ao alimento pela água, vento e manipulação humana, sugere-se que a presença nos peixes está associada a falhas durante a cadeia produtiva (processamento, manipulação e comercialização). Observou-se neste estudo que o peixe era acondicionado sem gelo, os recipientes estavam sujos, e o ambiente do mercado se encontrava em condições insalubres (presença de animais domésticos e saprófagos-urubus, lixo, poeira, etc.). Segundo Calvet et al. (2012), os fungos se multiplicam após a despesca e durante o processamento do produto, caso seja armazenado em temperatura inadequada. Esses microrganismos possuem um importante papel no processo de deterioração, ocasionando perdas da qualidade do produto e produção de micotoxinas, como as aflotoxinas.

Constatou-se também no presente estudo, que no mercado os comerciantes realizavam várias atividades ao mesmo tempo como a manipulação do peixe e recebimento do pagamento em dinheiro. De Oliveira et al. (2019), relatam que manipular alimentos e atender os clientes ao mesmo tempo aumenta a contaminação do alimento. Além disso, fatores intrínsecos dos peixes, como alta atividade de água, pH próximo à neutralidade, potencial redox e composição química, contribuem para sua deterioração mais acelerada (FREIRE et al., 2016). Uma vez que proporcionam o crescimento de micro-organismos.

Descrever essa variabilidade fúngica relacionada à contaminação de peixes é essencial para melhor compreender a dinâmica dos fungos e a possível presença de fungos produtores de micotoxinas nas amostras analisadas. De acordo com Calvet et al. (2012); Evangelista- Barreto et al. (2016) e Kim et al. (2020), torna-se importante estabelecer medidas de prevenção e controle de possíveis riscos à saúde pública, uma vez que certas moléculas de fungos são responsáveis pelo envenenamento em seres humano.

CONCLUSÕES

A microbiota fúngica identificada no presente estudo é composta por: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *Rhizopus* sp. *C. parapsilosis* e *C. haemulonii* isoladas de tubarões e raias.

Alguns são descritos pela literatura como principais produtores de micotoxinas, tais como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., enquanto outros como *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *C. parapsilosis* e *C. haemulonii*, estão associados às micoses cutâneas, subcutâneas e sistêmicas em humanos.

Os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Sporothrix* sp., *Rhizopus* sp. *C. parapsilosis* e *C. haemulonii* foram identificados pela primeira vez em elasmobrânquios.

O presente estudo revelou que os elasmobrânquios comercializados em São Luís do Maranhão podem representar espécies-chave para o monitoramento da qualidade do pescado e da segurança alimentar. Recomenda-se dessa forma o monitoramento regular do pescado comercializado em mercados e supermercados da referida cidade, visando a conscientização e melhoria dos serviços básicos de saúde.

REFERÊNCIAS

AFOLABI, C. G. Et al. Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 13, n. 1, p. 52-58, 2020.

BARRETO, R. R. et al. Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil. **Marine Policy**, v. 85, p. 114–122, 2017.

BATRA N. et al. Cladosporium sphaerospermum causing brain abscess, a saprophyte turning pathogen: Case and review of published reports. **Journal De Mycologie Médicale**, 2019.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 497-516, 2003.

BERNAL, K. J. P.; GREÑAS, L. P.; PATEÑA, M. A. N. Isolation and identification of fungi from dried fish and other seafoods sold in local market and selected supermarket in batangas city. **LPU–Laguna Journal of Allied Medicine**, v. 3, n. 1, 2018.

BREGONDE, R. B. Isolamento de scopulariopsis spp. em lesão de felino com esporotricose-relato de caso (isolation of scopulariopsis spp. in feline skin lesion with sporotrichosis – case report). **Archives of Veterinary Science**, v.25, n. 5, p. 19, 2020.

CALVET, R. M. et al. Fungos toxigênicos em camarões marinhos cultivados e potenciais toxigênicos das cepas isoladas de Aspergillus seção Flavi e seção Nigri. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 638-644, 2012.

CHANNIAIAH, L. H. An Overview of Mycotoxicosis and Human's Health Concerns: A Mini-Review. **Novel Techniques in Nutrition & Food Science**, v. 4, n. 1, p. 303–305, 2019.

COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant Candida species. **Current opinion**, v. 30, n. 6, 2017.

COLOMBO, A. L.; THAÍS GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

CROW, G. L; BROCK, J. A; KAISER, S. Fusarium solani fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (Sphyrna lewini) in Hawaii. **Journal of wildlife diseases**, v. 31, n. 4, p. 562–565, 1995.

DAS, S. et al. N-Acetyl-d-glucosamine Production by a Chitinase of Marine Fungal Origin: a Case Study of Potential Industrial Significance for Valorization of Waste Chitins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 407–423, 2019.

DE FREITAS, J. et al. Counting and identification of molds and yeasts in dry salted shrimp commercialized in Rio Branco, Acre, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 284-289, 2021.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Ed. 2. Amer Society for Microbiology. 2001.

DE MAGALHÃES, A. P. et al. Comercialização e microbiologia do pescado nas feiras livres de Porto Grande – Amapá, identificação de Salmonella spp. **Ciência e Tecnologia do Pescado: Uma Análise Pluralista**, v. 2. 2020.

DE MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. De. L.; LIMA, E. De O. Cladosporium spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2017.

DE OLIVEIRA, C. E. S. et al. Diversidade fúngica presentes em amostras de camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1862) (Decapoda, Palaemonidae) salgado e seco comercializado em Santarém Pará. **Scientia Amazônia**, v. 8, n.2, p. 45- 55, 2019.

DESOUBEAUX, G. et al. Multi-locus sequence typing provides epidemiological insights for diseased sharks infected with fungi belonging to the *Fusarium solani* species complex. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 591–601, 2018.

DIAMANT, A. et al. *Dasyatispora levantinae* gen. et sp. nov., a new microsporidian parasite from the common stingray *Dasyatis pastinaca* in the eastern Mediterranean. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 2, p. 137–150, 2010.

DOS REIS, D. H. C. et al. Avaliação do perfil microbiológico do peixe *pseudoplatystoma corruscans* e *colossoma macropomum* (pintado e tambaqui), comercializado no município de Rolim de Moura, tendo em foco a saúde pública. **RBCA**, v. 6 n. 1, p. 1 – 62, 2017.

DULVY, N. K. et al. Challenges and Priorities in Shark and Ray Conservation. **Curr. Biol**, v. 27, n. 11, p. 565–572, 2017.

ELBANNA, A. H. et al. Scopularides Revisited: Molecular Networking Guided Exploration of Lipopeptideptides in Australian Marine Fish Gastrointestinal Tract-Derived Fungi. **Marine Drugs**, v. 17, n. 475, 2019.

ERLACHER-REID, C. D. et al. Phaeohyphomycosis associated with ossification of the skull and cervical vertebrae in a swell shark (*Cephaloscyllium ventriosum*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, n. 4, p. 1081–1085, 2016.

EVANGELISTA- BARRETO, N. S. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do camarão salgado, seco e defumado comercializado em Cruz das Almas, Recôncavo da Bahia. **Acta Fish**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2016.

EVANGELISTA BARRETO, N. et al. Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 60-74–74, 2017.

FERNANDO, N. et al. Fatal *Fusarium solani* species complex infections in elasmobranchs: The first case report for black spotted stingray (*Taeniura melanopsila*) and a literature review. **Mycoses**, v. 58, n. 7, p. 422–431, 2015.

FERREIRA, E. M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arq. Inst. Biol**, v.81, n.1, p. 49-54, 2014.

FLORES-FLORES, M. E. et al. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.

FREIRE, B. C. F. et al. Qualidade de camarão (*litopenaeus vannamei*) minimamente processado. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.2, p.150-155, 2016.

GARCIA, M. V. et al. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. **Food Microbiology**, v. 73, p. 93- 98, 2018.

GOPINATH, R.; RAJ, R. P. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon*, Fabricius (1978) given aflatoxin B1 incorporated diets. **Aquaculture Research**, v. 40, p.1235-1242, 2009.

GUSMAO, B. Dos S. Esporotricose felina uma doença emergente de risco a saúde pública: aspectos clínico-epidemiológicos. **Revista científica de medicina veterinária**, n. 28, 2017.

INGLEY, A. P.; PARIKH, S. L.; DELGAUDIO, J. M. Orbital and cranial nerve presentations and sequelae are hallmarks of invasive fungal sinusitis caused by *Mucor* in contrast to *Aspergillus*. **Am J Rhinol**, v. 22, p. 155–8, 2008.

KIM, J. H. et al. Rapid elimination of foodborne and environmental fungal contaminants by benzo analogs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 6, 2020.

KUBITZA, F. Micotoxinas e seus efeitos sobre peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 20, n. 121, p.19-23, 2010.

LAURIN, E. et al. To pool or not to pool? Guidelines for pooling samples for use in surveillance testing of infectious diseases in aquatic animals. **Journal Fish Diseases**, v. 42, p. 1471–1491, 2019.

MACENA, T. N. DA S. et al. Análise qualitativa do perfil microbiológico de peixe in natura comercializado no mercado municipal de Teixeira de Freitas, BA. **Revista Mosaicum**, n. 27, 2017.

MARANCIK, D. P. et al. Disseminated fungal infection in two species of captive sharks. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 686–693, 2011.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

MICHELIN, E. C. et al. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 2, p. 265–272, 2016.

MUNAWAR, H.; KARIM, K.; PILETSKY, A. S. Utilization of synthetic antibody for fumonisin determination in feed and food. **Wartazoa**, v. 29, n. 2, p. 51-60, 2019.

MYLNICZENKO, N. D. et al. Blood culture results from healthy captive and free-ranging elasmobranchs. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, n. 3, p. 159–167, 2007.

NUNES, E. S. C. L. et al. Avaliação da qualidade do camarão salgado seco (aviú) e da farinha de peixe (piracuí) comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém, Pará. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.72, n. 2, p.147-54, 2013.

NUNES, L. P. S. et al. Monitoramento de fungos micotoxígenos em peixes cultivados, na água e substrato de viveiros em fazendas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.3, p.199-204, 2015.

OLIVEIRA, J. N.; OLIVEIRA, A. V.; MENEGHELLO, E. R. Análise Molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de Maringá PR. **Iniciação Científica CESUMAR**. v. 15, n. 2, p. 157-163, 2013.

PANKAJ, S. K.; SHI, H.; KEENER, K. M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 73–83, 2018.

PEREIRA, B. S. Pesquisa de aflatoxinas e fungos toxigênicos em amendoins comercializados em curitiba/pr e região metropolitana. **Caderno da Escola de Saúde**, v.18, n.1, p. 45-55, 2017.

PESTKA, J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 283-298, 2007.

PIRARAT, N. et al. Molecular and pathological characterization of *Fusarium solani* species complex infection in the head and lateral line system of *Sphyrna lewini*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 120, n. 3, p. 195–204, 2016.

POGOREUTZ, C. et al. Similar bacterial communities on healthy and injured skin of black tip reef sharks. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1–16, 2019.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; CHANG, P. K. Aflatoxins: mechanisms of inhibition by antagonistic plants and microorganisms. In: Guevara-González RG (Eds.). *Aflatoxins - biochemistry and molecular biology*. Queretaro: InTech, v. 1, n. 1, p. 255-282, 2011.

RODRIGUES, C. A. O. et al. Método fenotípico automatizado versus método manual na identificação de microrganismos isolados de hemoculturas: desfechos clínicos e microbiológicos. **ABCS Health Sciences**, v. 44, n. 2, p. 96- 102, 2019.

SANDOVAL-DENIS, M. et al. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2112– 2125, 2014.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 233-241, 2012.

SUN, K. et al. Indole Diterpenoids and Isocoumarin from the Fungus, *Aspergillus flavus*, Isolated from the Prawn, *Penaeus vannamei*. **Marine drugs**, v. 12, p. 3970-3981, 2014.

WITASZAK, N. et al. Contamination of pet food with mycobiota and *Fusarium* mycotoxins—focus on dogs and cats. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 130-144, 2020.

YANG, W-C. et al. Depsidone Derivatives and a Cyclopeptide Produced by Marine Fungus *Aspergillus unguis* under Chemical Induction and by Its Plasma Induced **Mutant**. **Molecules**, v. 23, n. 2245, 2018.

ANEXO- NORMAS DO PERIÓDICO PeerJ

Our open access journals

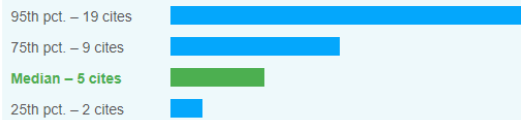


PeerJ

Covering life, biology, medicine, and environmental sciences

[Home](#) [Sections](#) [Articles](#) [Editorial Board](#) [Author guidelines](#) [Fees](#)

3-year citation distribution 30 Days to First Decision



* 3-year distribution is calculated from articles published between 30 and 36 months ago.

* 2-year JCR Impact Factor is 2.98. Read about responsible usage of the Impact Factor.

Submit article

[View impact metrics](#)

12,836 peer-reviewed articles published since 2013.



AUTHORS - SUBMIT ARTICLE

- 1 Please use clear, unambiguous, technically and grammatically correct English throughout.
- 2 Files:
 - Manuscript
 - Figures
 - Tables
 - Raw data or code files
 - Data or code is **almost always** required for review and publication.
 - **Note** Authors not submitting their raw data correctly is the top reason for delay.
 - Choose how you want to submit your raw data:
 1. Upload to PeerJ as a supplemental file.
 2. Upload to an [online repository](#) and submit access details (required for files over 30MB).
 - If owned by a third party, please submit written permission to publish.
 - If you cannot submit on grounds of privacy or safety, please submit a statement from the owners of the raw data or code explaining why.
 - Files must be machine-readable i.e. images, PDFs, Powerpoints etc. not accepted.
 - Supplemental files
 - Files that are not part of your main manuscript:
 - **Files for staff** (as appropriate)
 1. Ethics / Human participant / Field study / Vertebrate animals approval documents.
 2. Example human participant consent form.
 3. CONSORT flow diagram and checklist.
 4. PRISMA flow diagram and checklist.
 5. COREQ checklist.
 6. Trial protocol.
 7. Photo/video consent form.
 - **Files for publication**
 1. Raw data or code (required).
 2. Large supplemental datasets.
 3. Figures and tables.
 4. Articles.
 5. Video and audio.
 - Supplemental Files should not exceed 50 MB in total (30MB individual file limit). If you need more space please contact us.
- 3 Manuscript formatting:
 - US Letter.
 - Use line numbers.

3 Manuscript formatting:

- US Letter.
- Use line numbers.
- 2.5 cm margin on all edges.
- 12 point Times font for readability.
- 'Normal' style for text, 'Heading' styles for headings.
- Do not use 'unusual' document styles/templates (e.g. 'Normal (Web)').
- Left justify all text to the left margin. Do not 'full width' justify.
- Title guidance:
 - Be clear, appealing, interesting and specific.
 - Match the search queries used to find similar articles.
 - Be concise: ideally 20-60 words (250 character hard limit).
 - Avoid acronyms, abbreviations and jargon.
 - Accurately describe work.

4 Raw data or code submitted as either:

1. A link to a repository where the data and/or code is accessible (e.g. [Github](#), [Gitlab](#)).
2. or Supplemental file(s) containing the raw data or code.

- Machine-readable (PDF, Powerpoint, images etc. not accepted).
- Data or code is almost always required:
 - If the data is owned by a third party, please obtain permission to publish. Alternatively, submit a statement from the owners explaining why they cannot publish on the grounds of privacy or safety.
 - If too large, upload it to an online repository (e.g. [Figshare](#), [Dryad](#) etc).

5 LaTeX:

- Submit a single PDF with the full set of LaTeX source files.
- Use line numbers.
- [Overleaf](#) is a great LaTeX editor. Use our [template](#).

6 No cover letters or pre-submission inquiries needed.

7 You cannot publish any materials that have been published in a peer-reviewed journal previously.

Standard Sections

Use these Standard Sections where possible. Include any methodology or experiment sections appropriate to your field. Do not combine sections.

[Author Cover Page](#) (see below)

Abstract

- 500 word (3,000 character) limit.
- Self-contained, concise description of reason for the work, methodology, results, and conclusions.
- Uncommon abbreviations should be spelled out at first use.
- No footnotes or references (except when referencing a critiqued publication by DOI).
- Subheadings must be bold, followed by a period, and start a new paragraph e.g.

Background. The background section text goes here...

Introduction

Materials & Methods

Results

Discussion

Conclusions

Acknowledgments

- Do not acknowledge funders here, there is a separate Funding Statement for that. Everyone named in the acknowledgments section must be informed that they are named.

References

Literature Review standard sections

[Author Cover Page](#) (see above)

[Abstract](#) (see above)

Introduction

- Describe the field and explain why this review is needed.
- Explain relevance to readers in the field, and associated areas.
- Cite previous reviews.

Survey Methodology

- Explain how you ensured comprehensive and unbiased coverage of the literature.

Subheadings

- We recommend that you subdivide your article into a small number of major topic

Subheadings

- We recommend that you subdivide your article into a small number of major topic areas.

Conclusions

- Identify unresolved questions / gaps / future directions.

Acknowledgments (see above)

References

⚠ Also read the policies for literature reviews.

Author cover page

- 1 Included as the first page of your manuscript ([view example](#)).
- 2 Author info entered online must **exactly match** the author info listed on your Author Cover Page.
- 3 Author Cover Page structure:
 - Article title
 - Authors
 - First given names (or first initials in combination with full middle names).
 - Middle name initial(s).
 - Family name (surname).
 - Affiliations (indicate multiple affiliations, or current addresses where appropriate).
 - Department, university, or organizational affiliation.
 - Location: city, state/province (if applicable).
 - Country.
 - Submission admin
 - First and Last name.
 - Email address.
- OR
- If authored by a consortium, list names and affiliations in correct order in the Acknowledgments section.
- 4 All authors must meet the ICMJE [authorship](#) requirements. Include other contributors in the Acknowledgments section.

Reference Format

Choose your style

PeerJ prefers you spend your time doing science, not formatting references!

Submit your references in whatever style you like.

Just make sure they're full, clear, and consistent and we'll standardize at production.

PeerJ uses the 'Name, Year' style with an alphabetized reference list.

In-text citations

- For three or fewer authors, list all author names (e.g. Smith, Jones & Johnson, 2004). For four or more, abbreviate with 'first author' et al. (e.g. Smith et al., 2005).
- Multiple references to the same item should be separated with a semicolon (;) and ordered chronologically.
- References by the same author in the same year should be differentiated by letters (Smith, 2001a; Smith, 2001b).
- Cite articles accepted for publication as 'in press'. Include in reference section and upload as a Supplemental file.
- Cite work unpublished, in preparation or under review as 'unpublished data'. Supply the author's first initial and surname, and the year of the data collection, in the text citation and do not include the citation in the reference section. Example: (A Castillo, 2000, unpublished data).
- Avoid referencing personal communications. Reference as 'pers. comm.', including the first initial and surname, and year. Example: (A Castillo, 2000, pers. comm.).

The Reference Section

- Journal reference format: List of authors (with initials). Publication year. Full article title. *Full title of the Journal*, volume: page extents. DOI (if available).

Example journal reference:

Smith JL, Jones P, Wang X. 2004. Investigating ecological destruction in the Amazon. *Journal of the Amazon Rainforest* 112:368-374 DOI: 10.1234/amazon.15886.

- Gray Literature (e.g. patents, technical reports from agencies or research groups, working papers, white papers, preprints etc.) described thoroughly: Authors. Page/paper title. Publication date. Publisher name. URL (access date). Identification (e.g. patent or series) numbers.

Example gray literature references:

Boettiger C. 2013. knitcitations: citations for knitr markdown files. Available at <https://github.com/cboettig/knitcitations> (accessed 18 July 2012)

Dorch B. 2012. On the Citation Advantage of linking to data. *hprints*. Available at <http://hprints.org/hprints-00714715> (accessed 5 July 2012)

• Example book reference:

James FY. 2010. *Understanding corn and wheat*. Oxford: Oxford University Press.

• Example book excerpt:

Smith PG. 2011. Behavior in ants. In: Jones HY, ed. *Insect behavior in the Andes*. Berlin: Springer Verlag, 181-200.

• Example thesis:

Blair HJ. 1989. Structural modifications of the fern genus *Leconopteris* (Polypodiaceae). D. Phil. Thesis, Cambridge University.

• Example webpage:

Johnson S. 2010. Italian Plants. Available at <http://www.italianplants.com> (accessed 22 March 2011).

• Example abstract:

Thomas D, Scharfenecker U, Schiltseger B. 2006. Low potential for drug-drug interaction of lacosamide. [Abstract 2.235] *Epilepsia* 47(Suppl 4): 208.

- Reference Section sorted by Author, Year, Title. All citations must be present in the reference section, and all references cited in the text. Place non-cited references in a "Further Reading" section.
- Zotero users please download [PeerJ Zotero style](#).
- EndNote users please download [PeerJ Endnote style](#) and:
 - Open EndNote.
 - Open library (the citation file).
 - Set style to "PeerJ".
 - Go to Edit -> Output Styles -> Edit "PeerJ".
 - Under Bibliography -> Author Lists, set "Abbreviated author list" to "List all author names".

File Types


Manuscript

Manuscript checks

- Manuscript document formats:
 - **.DOCX (Preferred)** and .DOC
 - .TeX (+ PDF with embedded figures and tables)
 - .ODT
 - .RTF
- US Letter.
- Use [line numbers](#).
- 2.5cm margin on all edges.
- 12 point Times font for readability.
- 'Normal' style for text, 'Heading' styles for headings.
- Do not use 'unusual' document styles/templates (e.g. 'Normal (Web)').
- Left justify all text to the left margin. Do not 'full width' justify.

Figures

Figure and Table checks

 **Figures** Use the original file format and image size whenever possible.

Vector images
(e.g. charts, diagrams):

- PDF
 - US Letter size
 - 2.5cm margins
- EPS

Raster/bitmap images
(e.g. drawings, screenshots):

- PNG (preferred)
 - JPEG (photographs only)
- Ideal width/height: 3000px (minimum 900px).

- **Please upload as separate files (i.e. do not embed in manuscript).**
- 'Figure' refers to graphs, charts, line drawings and photographs.
- Lower quality images may be accepted for review, but these must be replaced with high-quality (300dpi) images on resubmission.
- Include figure numbers in filenames e.g. 'Figure 1.png'.

- Titles are required for all figures (legends are optional):

- **Title format**



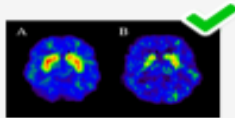
- **Legend format (optional)**



- All figures must be cited in the main text.
- Figure order:
 - Figure 1 appears first in the text, and first cited.
 - Figure 2 appears second, and the next cited after Figure 1.
 - etc...
- When citing use the abbreviation 'Fig.'. When starting a sentence with a citation, use 'Figure 1'.
- Minimum white space around each figure/figure part.



- Label with a readable, uniform font. Vertical height of 2mm suggested.
- Multi-part or single images should not span multiple pages.
- Multi-part figures submitted in one file and arranged as they are to be published.



Tables

Figure and Table checks

- Table document formats:
 - **.DOCX (Preferred)** or .DOC
 - .ODT
 - .TEX
- Please upload as separate files (i.e. do not embed in manuscript).
- Include table numbers in filenames e.g. 'Table 1.png'.
- Titles are required for all tables (legends are optional):
 - **Title**

Table 1:
Model comparison between naive Bayes, Bayesian network classifiers (BNC), and random forest.

These algorithms were conducted on the first 1000 pixels of the image, and the binarized value corresponding to whether the intensity of a pixel was above average.

- **Legend** (optional)

Table 1:
Model comparison between naive Bayes, Bayesian network classifiers (BNC), and random forest.

Three algorithms were evaluated on the UCI handwritten digits dataset, fed in the binarized value corresponding to whether the intensity of a pixel was above average. The fitting time and test set accuracy are reported for each algorithm.

Model	Fitting time (s)	Test set accuracy
Naive Bayes	0.05	0.79
BNC	0.5	0.87
Random forest	1.4	0.89

DOI: 10.7717/peerj.122/figure-1

- Table order:
 - Table 1 appears first in the text, and first cited.
 - Table 2 appears second, and the next cited after Table 1.
 - etc...
- Cite tables in text as 'Table 1', 'Table 2' etc.
- Include units in column and row headings, in parentheses.
- Tables must fit in a single 21.6 x 28 cm page with 2.5 cm margins.
- Place footnotes below the table; these may be used to explain abbreviations.

Figure and table referencing

- For figures, videos or tables containing copyrighted material not created by one of the authors (e.g. photographs, maps):
 - Upload a document with the copyright owner's permission to publish under a CC BY license ([download photo/video permission letter template](#)).
 - Add a credit attribution in the legend.
- When submitting photographs please indicate the identity of the photographer.
- Examples of credit attributions:

Photo credit: San Diego Zoo Global.

Photo credit: Ali Seith.

Image credit: the MESH archive at <http://ondesand.nssl.noaa.gov>

Image credit: the MESH archive at <http://ondesand.nssl.noaa.gov>

3D model credit: Ishaqal Kreill

Map data © 2021 Google

- For figures with identifiable human subjects:
 - Written consent from the human subject. If the subject is a minor, consent must be provided from their parent or guardian. ([download human subject permission letter template](#)).
 - Upload a document with the copyright owner's permission to publish under a CC BY license ([download photo/video permission letter template](#)).

If written consent cannot be obtained, then the figure must be replaced by a figure without identifiable human subjects. Per ICMJE, measures such as blurring faces or masking the eye region in the photographs of patients is inadequate protection of anonymity.

- Cite map sources. If using Google Earth or Google Maps also [attribute the third-party data providers](#) used by the map:
 - In the figure legend.
 - On the figure.
- Use maps which allow unrestricted re-use where possible.

TeX / LaTeX users

Submit your complete PDF manuscript, TEX, BIB, hi-res figures and tables.

Raw data or code

- All authors are responsible for making materials, code, raw data and associated protocols relevant to the submission available without delay.
- Data or code should be submitted to a specialist database if appropriate (e.g. [GenBank](#) for sequences, [Morphosource](#) for 3D models and scans, etc.).
- Recommended data or code repositories:
 - An institutional repository
 - [Zenodo](#) (free & unlimited)
 - [Figshare](#) (20GB free)
 - [Dryad](#) data storage
 - [Galaxy server](#) (1GB to 2TB+)
 - [Git Large File Storage](#) (1GB free)
 - [Github](#) (code)
 - [Gitlab](#) (code)