

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
Tese será disponibilizado somente  
a partir de 17/11/2027

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP- CAUNESP**

**DANIEL DE ABREU REIS FERREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE  
*Flavobacterium* spp. ISOLADAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO NO  
BRASIL**

**Daniel de Abreu Reis Ferreira  
Biólogo**

Jaboticabal  
2025

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE  
*Flavobacterium* spp. ISOLADAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO NO  
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia

**Doutorando: Daniel de Abreu Reis  
Ferreira**

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski**

Jaboticabal  
2025

F383c

Ferreira, Daniel de Abreu Reis

Caraterização fenotípica e genotípica de *Flavobacterium* spp.  
isoladas de peixes de produção no Brasil / Daniel Ferreira. --  
Jaboticabal, 2026

107 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientadora: Fabiana Pilarski

1. Epidemiologia. 2. Microbiologia veterinária. 3. Genética. 4.  
Bioinformática. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Flavobacterium* spp. ISOLADAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO NO BRASIL

AUTOR: DANIEL DE ABREU REIS FERREIRA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

COORIENTADORA: LIANE NEY BASSINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **FABIANA PILARSKI**  
Data: 17/11/2025 14:17:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / CAUNESP UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **SÍLVIA UMEDA GALLANI**  
Data: 22/11/2025 13:37:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SÍLVIA UMEDA GALLANI (Participação Virtual)

Aquicultura (UNL/INPA) / Universidade Nilton Lins (UNL) - Manaus/AM

Documento assinado digitalmente  
 **MARITA VEDOVELLI CARDOZO**  
Data: 26/11/2025 09:40:59-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **JULIANA ANTUNES GALVAO**  
Data: 28/11/2025 08:50:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professora Doutora JULIANA ANTUNES GALVÃO (Participação Virtual)

Departamento de Tecnologia de Alimentos / ESALQ USP Piracicaba/SP

Documento assinado digitalmente  
 **DANIEL GUARIZ PINHEIRO**  
Data: 28/11/2025 09:35:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (Participação Virtual)

Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de novembro de 2025.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Daniel de Abreu Reis Ferreira, solteiro, nascido na cidade do Rio de Janeiro, em 06 de setembro de 1992. Durante o período anterior à graduação, desempenhei atividades relevantes para o contexto da presente tese, destacando-se a experiência como auxiliar veterinário, com curso completo realizado pelo CPEA – unidade São Carlos/SP, além de estágio junto ao Canil Municipal da cidade de Descalvado/SP. São Carlos foi a cidade onde cresci e vivi desde a infância, e onde concluí o curso acima citado enquanto cursava o ensino médio na antiga escola CAASO – Centro Acadêmico Armando de Salle Oliveira. Já nesse período, identifiquei afinidade com a área da Biologia, despertando o interesse em aprofundar meus conhecimentos nesse campo. Em 2014, ingressei no curso de Ciências Biológicas, modalidade bacharelado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal-SP. A graduação proporcionou sólida formação técnica e prática em diversos tópicos da Biologia, abrangendo desde atividades educativas, nas quais participei de projetos com alunos da rede pública municipal de diferentes faixas etárias até ações de campo voltadas à agropecuária e a conservação ambiental. Concluí a graduação com trabalho de pesquisa orientado pela profa. Cinthia Peralta de Almeida Prado e coorientado pelo prof. Marcos Rogério André, cujo objetivo foi o levantamento de hemoparasitos, com ênfase no grupo das hemogregarinas, em anuros de vida livre. O desenvolvimento do trabalho foi impulsionado pelo sucesso e pela publicação do meu primeiro artigo científico na revista *Parasitology Research*. A partir desse momento, surgiu o interesse em realizar estudos com patógenos e organismos infecto-contagiosos em animais, o que me motivou a ingressar no Mestrado acadêmico, em 2018, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, sob orientação da profa. Dra. Fabiana Pilarski. Durante o mestrado, adaptei-me a uma nova rotina laboratorial voltada à microbiologia, realizando análises sorológicas e hematológicas em peixes, além de implementar *in vivo* utilizando teleósteos como modelo animal. Tive também experiências de campo, mantendo uma relação de troca de conhecimentos com o setor produtivo, e participei da elaboração de relatórios técnicos para empresas, envolvendo desde teste de produtos até análises financeiras ao custo de implementação de projetos. O conhecimento acumulado ao longo do mestrado

resultou na publicação do meu segundo artigo científico, oriundo do projeto desenvolvido, na revista *Aquaculture*, uma das mais conceituadas da área, descrevendo o potencial patogênico de um microrganismo de grande relevância para produção aquícola. Na sequência, iniciei o doutorado, onde venho aplicando e refinando os conhecimentos adquiridos, além de desenvolver habilidades em gestão de equipes e transferência de conhecimento. Tenho atuado na linha de frente de diversos projetos desenvolvidos pelo grupo e grupos parceiros, o que resultou na publicação de mais três artigos em periódicos de alto impacto (Q1 e Q2) nas áreas de aquicultura e saúde animal. Além das publicações, participei de inúmeros congressos, workshops e simpósios, divulgando diferentes etapas da produção científica em que estive envolvido. Destaca-se também minha participação em um congresso internacional na Colômbia, onde estabeleci redes de colaboração com pesquisadores de renome na área de sanidade aquícola.

“There’s a natural mystic blowing through the air, can’t keep them down, if you listen carefully now, you will hear”. Robert Nesta Marley  
(Bob Marley)



## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado a minha filha Anna Lua Borba de Abreu, obrigado por ser a raiz de toda minha motivação e por fazer esta trajetória mais lúdica e excepcional.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), através da concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 2022/15248-7) e auxílio financeiro para o desenvolvimento da tese aqui apresentada.

Gostaria de destacar a importância destes e de outros órgãos de fomento para o avanço da ciência e da formação especializada no Brasil. O investimento contínuo em pesquisa e educação contribuiu significativamente para o progresso do país, gerando impactos sociais e econômicos positivos e duradouros.

Gostaria de direcionar meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Profa. Dra. Fabiana Pilarski, por ter sido não apenas uma tutora, mas também minha amiga ao longo de toda trajetória na pós-graduação. Sua dedicação e comprometimento com o desenvolvimento profissional e pessoal para minha evolução profissional e de todos meus companheiros de laboratório.

Do fundo do meu coração, agradeço ao Prof. Dr. Inacio Mateus Assene, não só pela amizade durante este período tão importante da minha vida, mas também por sua confiança em minha capacidade técnica para conduzir experimentos complexos, pesquisador despertando em mim uma paixão intensa pela ciência, uma energia que me impulsiona até hoje. Não consigo encontrar palavras que expressem minha admiração por você.

Aproveito para agradecer pelas oportunidades singulares que a vida acadêmica me proporcionou: desde a realização de procedimentos técnico-laboratoriais de ponta até a vivência direta com o setor produtivo, reforçando minha convicção de que a pesquisa científica deve sempre servir à sociedade como um todo.

Sinto orgulho e felicidade ao ter vivenciado a experiência do estágio docência, que me permitiu estar perto de futuros pesquisadores. Foi nesse contato que revivi o despertar da minha vocação, e que deu início da minha própria jornada acadêmica.

O desenvolvimento desta tese também foi marcado pela aquisição de habilidades em gestão metodológica, de recursos humanos e financeiros, aplicadas em diversas linhas de pesquisa dentro e fora do meu laboratório. Aprendi que ensinar

também é uma forma poderosa de aprender; essa verdade foi evidenciada ao longo da minha trajetória, à medida que aprofundei meus conhecimentos.

Agradeço profundamente a todas as pessoas com quem tive o privilégio de conviver durante o desenvolvimento da minha tese. Foram muitas, mas gostaria de destacar meus parceiros de laboratório: Amarildo, Zacarias, Elielma, Eric, Gabriela, Isis, Alex, Maiara, Guilherme, Vinicius, Mariana, Débora, Daiane, entre tantos outros que, mesmo brevemente, contribuíram para minha formação acadêmica.

Meu sincero agradecimento ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto, por abrir as portas de seu laboratório durante todo o período da pós-graduação, possibilitando que eu vivenciasse um ambiente tecnicamente enriquecedor, onde pude desenvolver diversas etapas laboratoriais em biologia molecular e bioinformática.

Por fim, e mais importante de tudo, agradeço a minha filha, Anna Lua, por ser a luz que ilumina minha vida, com você tudo é um paraíso. Não consigo imaginar minha vida, nem este trabalho, ser o que é hoje se não fosse por você, minha eterna amiga. Juntos enfrentamos inúmeros desafios, e você sempre esteve comigo, inclusive no período experimental, em que me ajudou muito a alimentar os peixinhos quando foi necessário.

Agradeço também, do fundo do meu ser, à minha mãe Elaine, ao meu pai Lincoln, aos meus irmãos Gabriel e Diogo e minhas sobrinhas Eloá e Lara, por serem meu alicerce, meu acolhimento e os vínculos preciosos que tenho a sorte de ter em minha vida. Muito obrigado pela família “complicada e perfeitinha” que eu tenho.

Concluo meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, pela oferta de um ambiente acadêmico rico em oportunidades, incluindo a possibilidade de poder aproveitar cursos e disciplinas de excelência durante o doutorado.

## SUMÁRIO

|                            | Página     |
|----------------------------|------------|
| <b>RESUMO.....</b>         | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>       | <b>iii</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 –.....</b>   | <b>01</b>  |
| Introdução Geral.....      | 01         |
| Revisão de literatura..... | 02         |
| Referencias.....           | 16         |
| <b>CAPÍTULO 2 –.....</b>   | <b>20</b>  |
| Resumo.....                | 21         |
| Introdução.....            | 22         |
| Material e Metodos.....    | 25         |
| Resultados.....            | 29         |
| Discussão.....             | 33         |
| Conclusão.....             | 36         |
| Referencias.....           | 37         |
| <b>CAPÍTULO 3 –.....</b>   | <b>58</b>  |
| Resumo.....                | 59         |
| Introdução.....            | 60         |
| Material e Métodos.....    | 62         |
| Resultados.....            | 68         |
| Discussão.....             | 70         |
| Conclusão.....             | 72         |
| Referencias.....           | 73         |

## RESUMO

O estudo de bacterioses que impactam a produção aquícola representa uma das metas estratégicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. Diversas espécies bacterianas desempenham um papel significativo nas infecções que acometem animais aquáticos, especialmente peixes de produção. Dentre agentes patogênicos de maior relevância para peixes, destacam-se os pertencentes ao gênero *Flavobacterium*, reconhecido por sua capacidade de causar doenças com impactos expressivos na saúde dos peixes e na produtividade dos sistemas aquícolas. Segundo o levantamento da literatura científica, o gênero *Flavobacterium* é atualmente composto por aproximadamente 316 espécies. Diversas destas espécies têm sido comumente e pontualmente relatadas em casos clínicos e surtos na criação de peixes, tanto em sistemas de produção para consumo quanto em criações ornamentais. A cada ano, novas interações envolvendo espécies do gênero anteriormente associadas apenas a ambientes naturais vêm sendo descritas em associação a sinais clínicos em peixes, evidenciando a crescente importância sanitária do gênero. Diante deste cenário, o presente estudo analisou isolados clínicos obtidos de diferentes espécies de peixes, com foco em sua caracterização genômica e fenotípica. A identificação das espécies foi realizada por meio da análise de similaridade com o gene 16S rRNA em comparação com estirpes de referência do gênero *Flavobacterium*, além da avaliação do panorama genômico dos isolados diagnosticados. Esta abordagem revelou características importantes que evidenciam a alta diversidade genômica e fenotípica entre isolados do gênero *Flavobacterium*, destacando a necessidade de monitoramento epidemiológico. Tais medidas são fundamentais para o desenvolvimento de imunoterapias e estratégias veterinárias para o controle de doenças na aquicultura. Os resultados obtidos neste estudo fornecem uma base sólida para futuros estudos sobre a diversidade fenotípica e genotípica, com destaque para *F. oreochromis*, a espécie mais prevalente diagnosticada, frequentemente associada a casos clínicos em peixes tropicais. Esperamos que nossos achados contribuam para o aprimoramento das práticas sanitárias e para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis na aquicultura brasileira.

**Palavras-chave:** epidemiologia, *Flavobacterium*, aquicultura.

## ABSTRACT

The study of bacterial diseases affecting aquaculture production represents one of the strategic goals for the sustainable development of aquaculture in Brazil. Various bacterial species play a significant role in infections that affect aquatic animals, particularly farmed fish. Among the most relevant pathogenic agents for fish are those belonging to the genus *Flavobacterium*, recognized for their ability to cause diseases with substantial impacts on fish health and aquaculture productivity. According to a review of the scientific literature, the genus *Flavobacterium* currently comprises approximately 316 species. Several of these species have been frequently and specifically reported in clinical cases and outbreaks in fish farming, both in food production systems and ornamental aquaculture. Each year, new interactions involving species previously associated only with natural environments are being described in connection with clinical signs in fish, highlighting the growing sanitary importance of this genus. In light of this scenario, the present study analyzed clinical isolates obtained from different fish species, focusing on their genomic and phenotypic characterization. Species identification was performed through similarity analysis of the 16S rRNA gene compared to reference strains of the *Flavobacterium* genus, along with an evaluation of the genomic landscape of the diagnosed isolates. This approach revealed important characteristics that demonstrate the high genomic and phenotypic diversity among *Flavobacterium* isolates, emphasizing the need for ongoing epidemiological monitoring. Such measures are essential for the development of immunotherapies and veterinary strategies aimed at disease control in aquaculture. The findings of this study provide a solid foundation for future research on phenotypic and genotypic diversity, with particular emphasis on *F. oreochromis*, the most prevalent species identified, frequently associated with clinical cases in tropical fish. We hope our findings contribute to the improvement of sanitary practices and the development of more sustainable strategies for Brazilian aquaculture.

**Keywords:** epidemiology, *Flavobacterium*, aquaculture

## CAPITULO 1- Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o avanço das técnicas de sequenciamento genômico e a grande quantidade de dados à disposição pública, estudos baseados em Overall Genome Related Indices (OGRIs) vêm ganhando atenção para solucionar incertezas taxonômicas (Madhaiyan et al., 2020a, 2020b; Meier-kolthoff et al., 2014).

Dentre estes índices destacam-se o conteúdo G+C, Average Nucleotide Identity (ANI) e digital DNA-DNA hybridization (ddDNA), que associados podem fornecer informações importantes para a classificação de espécies (Chun et al., 2018). Atualmente, o Código Internacional de nomenclatura de procariotos (ICNP) está em processo de revisão das diretrizes taxonômicas aplicadas aos procariotos, incorporando abordagens modernas baseadas em *Overall Genome Relatedness Indices* (OGRIs) . Essa atualização visa refletir com maior precisão as relações evolutivas e genômicas entre os microrganismos, promovendo uma classificação mais robusta e alinhada com os avanços da genômica comparativa. (Oren et al., 2021a, 2021b).

A *Flavobacterium columnare*, agente etiológico da columnariose em peixes de água doce, é um bacilo longo, Gram-negativo, de crescimento fastidioso e responsável por infectar uma grande variedade de espécies de peixes, tanto em populações naturais (Barony et al., 2015) quanto em sistemas de produção aquícola, (Austin and Austin, 2007; Lafrentz et al., 2012) causando perdas econômicas significativas para o setor (Wagner et al., 2002).

A espécie apresenta ampla disseminação na piscicultura e apresenta distribuição global, com elevado grau de diversidade genética entre isolados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. Estudo realizado por LaFrentz et al. (2018) analisou os metadados associados às sequências do gene 16S rRNA e outros genes estruturais extraídos do GenBank e observou através de análises filogenéticas multi-locus a formação de quatro clados denominados grupos genéticos (GGs). Os autores também observaram que os genes 16S rRNA e *dnaK* apresentaram elevado potencial discriminatório para a identificação de *Flavobacterium columnare*, permitindo



a divisão das linhagens analisadas em clados consistentes, com altos valores de suporte filogenético. Os metadados associados às cepas analisadas (n=150) indicaram que cada GG apresentou especificidade em relação ao hospedeiro. A análise dos metadados associados às cepas estudadas (n = 150) indicou que cada Grupo Genético (GG) apresenta especificidade em relação ao hospedeiro, reforçando a importância da caracterização molecular para compreender a diversidade intraespecífica e os padrões epidemiológicos da espécie.

Estudos de genômica comparativa em *F. columnare* identificaram que o genoma da espécie possuía aproximadamente 3Mb, variando de 3,1 a 3,39Mb (Kumru et al., 2020). Destaca-se a presença de numerosas ilhas genômicas (IGs) de tamanhos variados, entre 5 e 30 Kb, com até 40 IGs na cepa ATCC 49512, número significativamente superior ao observado em outras espécies do gênero (Kayansamruaj et al., 2017; Tekedar et al., 2017). Esses resultados indicam que o genoma de *F. columnare* apresenta alta plasticidade, uma vez que as IGs desempenham um papel fundamental na estrutura genética e na distribuição de genes relacionados à virulência e à resistência em populações bacterianas. Normalmente, estas regiões genômicas, por terem origem em outro indivíduo, muitas vezes de outras espécies, apresentam diferenças no conteúdo G+C em relação ao restante do genoma. No entanto, em *F. columnare* observa-se uma baixa variação no conteúdo de G+C entre as IGs e o restante do genoma, o que pode indicar um processo de estabilização genômica ou adaptação evolutiva específica.

Todavia, foram identificadas proteínas associadas ao processo de transferência horizontal, como integrases, transposons e proteínas relacionadas a bacteriófagos (Tekedar et al., 2017). Outros estudos baseados em comparações genômicas demonstraram que algumas cepas apresentavam elevada divergência genômica em relação às sequências de referência disponíveis no GenBank (Ashrafi et al., 2015; Kayansamruaj et al., 2017), o que motivou uma revisão taxonômica da espécie.

Recentemente, *Flavobacterium columnare* foi reclassificada por Lafrentz et al. (2022) por meio de uma abordagem polifásica, que incluiu a comparação de OGRIs com genomas de referência, além da análise de características fenotípicas da bactéria, como temperatura de crescimento, pH, halotolerância e perfil enzimático de

isolados pertencentes a diferentes grupos genéticos (GGs). Com base nesses dados, os autores propuseram a divisão da espécie em quatro novas espécies: *F. columnare* (GG1), *F. covae* (GG2), *F. davisii* (GG3) e *F. oreochromis* (GG4).

Para que avanços consistentes sejam alcançados, é essencial o monitoramento dos genes mencionados e a disponibilização de suas sequências em bases de dados públicas, informação ainda escassa no caso de isolados brasileiros do gênero *Flavobacterium*.

A espécie *Flavobacterium oreochromis*, recentemente classificada a partir de isolados pertencentes ao grupo genético 4 (GG4), apresenta distribuição predominante em países asiáticos, tendo como principal hospedeiro a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Alguns estudos já indicam sua possível dispersão para países da América do Sul (LaFrentz et al., 2018), o que reforça a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre sua diversidade genética.

Para isso, são necessárias técnicas de alta resolução, como análise filogenética multilocus (MLPA), que permitem uma caracterização mais precisa das cepas. Com a nova classificação proposta por Lafrentz et al. (2022), a estirpe Costa Rica 02-04-TN (nº de acesso: NZ\_CP067377.1) passou a ser considerada a estirpe referência para a espécie *F. oreochromis*. No entanto, até o momento, apenas duas outras estirpes asiáticas (NK01, 1215) possuem genomas depositados em bases públicas, evidenciando a necessidade de sequenciamento genômico de novas cepas para subsidiar estratégias eficazes de contenção desse patógeno emergente.

A cepa DV001, isolada durante um surto em uma produção comercial de tilápia-do-nilo no ano de 2018, demonstrou a elevada virulência em infecção experimental com pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Estudos anteriores caracterizaram essa cepa como *F. columnare* (GG4), atualmente, sinônimo de *F. oreochromis*, com base em análises moleculares e filogenéticas. Destaca-se a notável divergência de nucleotídeos observada no fragmento de 1,3Kb do gene 16S rRNA, quando comparado a outras estirpes filogeneticamente relacionadas (Ferreira et al., 2022).

Desta forma, este estudo teve como objetivo realizar o sequenciamento completo do genoma da cepa DV001, bem como de outras 12 cepas de *Flavobacterium* spp. pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia

e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA). Os patógenos foram isolados de diferentes espécies de peixes produzidos no Brasil. A proposta inclui a obtenção de um painel genético por meio de análises computacionais dos genomas sequenciados, além da realização de testes *in vivo* para avaliação comparativa da virulência dos isolados. Os desafios experimentais serão conduzidos com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), pacu e tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécies de grande relevância para a aquicultura nacional.

Esta abordagem, aliada às análises de distribuição de elementos genéticos móveis e genes de virulência, fornecerá dados essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenicidade das espécies recentemente classificadas. As metas analíticas relacionadas a esses aspectos serão discutidas ao longo desta tese, com o objetivo de contribuir para o avanço do conhecimento sobre a diversidade funcional e genômica do gênero *Flavobacterium*.

## 5. Conclusions

The newly assembled genomes presented in this study provide a valuable resource for future taxonomic investigations within the *Flavobacterium* genus, enabling more accurate identification of novel and ecologically relevant species. Our high-throughput

comparative approach has yielded important insights into the evolutionary dynamics of *Flavobacterium*, particularly in relation to host adaptation and genomic diversity.

These new genomic descriptions will serve as a foundation for future epidemiological studies and support the current taxonomic framework of the genus. The data generated here contribute to a deeper understanding of species boundaries and evolution, reinforcing the importance of integrating genomic tools into microbial taxonomy and disease surveillance.

### **Acknowledgments**

I would like to thank Professor Saura Rodrigues and Professor Vitor Miranda for their support and guidance throughout on sequencing process, as well as for their assistance in providing the necessary consumables. I also extend my thanks to the International Atomic Energy Agency (IAEA) for supplying the sequencing equipment (MinION) through the ARCAL (Project RLA5086).

This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant process number 2022/15248-7, and by CAPES through institutional funding (Financial Code 001).

### **Data availability**

All raw data will be deposited in the SRA database, and the final assembled deposited under the NCBI database and re-annotated with PROKA (Prokaryotic Automated Annotation Pipeline). All scripts used were revised and deposited in the supplementary material (descriptions of the workflow in the Portuguese language).

### **References**

- Abdelhamed, H., Nho, S. W., Karsi, A., & Lawrence, M. L. (2021). The role of denitrification genes in anaerobic growth and virulence of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1062–1074. <https://doi.org/10.1111/jam.14855>
- Alexandre, F. De, Benjamin, S., Soto, E., Shelley, J. P., Stevens, B., Marancik, D., Dunker, F., & Reavill, D. (2019). *Flavobacterium inkyongense* isolated from ornamental cichlids. *Journal of Fish Diseases*, 42(May), 1309–1313. <https://doi.org/10.1111/jfd.13043>
- Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., & Ogata, H. (2020). KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 36(7), 2251–2252. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859>
- Bader, J. A., Moore, S. A., & Nusbaum, K. E. (2006). *The effect of cutaneous injury on a reproducible immersion challenge model for Flavobacterium columnare infection in channel catfish (Ictalurus punctatus)*. 253, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.059>
- Bader, J. A., Nusbaum, K. E., & Shoemaker, C. A. (2003). *Comparative challenge model of Flavobacterium columnare using abraded and unabraded channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque)*. 461–467.
- Barbier, P., Rochat, T., Mohammed, H. H., Wiens, G. D., Bernardet, J. F., Halpern, D., Duchaud, E., & McBride, M. J. (2020). The type IX secretion system is required for virulence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16), 1–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.00799-20>
- Bernardet, J., & Bowman, J. P. (2006). The Genus *Flavobacterium*. In *The Prokaryotes* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8>
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Fraser, S., Group, C., Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). *IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets*. 45(May), 30–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
- Bonenfant, Q., Noe, L., & Touzet, H. (2023). Porechop ABI: Discovering unknown adapters in Oxford Nanopore Technology sequencing reads for downstream trimming. *Bioinformatics Advances*, 3(1), 0–3. <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbac085>
- Castresana, J. (2000). Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 17(4), 540–552. <https://academic.oup.com/mbe/article/17/4/540/1127654>

Chen, Z., Erickson, D. L., & Meng, J. (2020). Benchmarking long-read assemblers for genomic analyses of bacterial pathogens using Oxford Nanopore sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21239161>

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X., Meyer, S. De, & Trujillo, M. E. (2018). *Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes*. 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>

Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>

de Alexandre Sebastião, F., LaFrentz, B. R., Shelley, J. P., Stevens, B., Marancik, D., Dunker, F., Reavill, D., & Soto, E. (2019). *Flavobacterium inkyongense* isolated from ornamental cichlids. *Journal of Fish Diseases*, 42(9), 1309–1313. <https://doi.org/10.1111/jfd.13043>

Dong, H. T., Nguyen, V. V., Mata, W., Kayansamruaj, P., Senapin, S., Nilubol, D., & Rodkhum, C. (2016). Diversity of non-*Flavobacterium columnare* bacteria associated with columnaris-like diseased fish. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 46(2), 251–259.

Dong, H. T., Senapin, S., Lafrentz, B., & Rodkhum, C. (2016). Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry. *Journal of Fish Diseases*, 39(6), 649–655. <https://doi.org/10.1111/jfd.12385>

Dong, K., Chen, F., Du, Y., & Wang, G. (2013). *Flavobacterium enshiense* sp. nov., isolated from soil, and emended descriptions of the genus *Flavobacterium* and *Flavobacterium cauense*, *Flavobacterium saliperosum* and *Flavobacterium suncheonense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART3), 886–892. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039974-0>

Doug Hyatt, Gwo-Liang Chen, Philip F LoCascio, Miriam L Land, , Frank W Larimer, L. J. H. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *Nature Communications*, 6(1), 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407863-5.00023-X>

<http://www.nature.com/doi/10.1038/ismej.2009.79>

com/doi/10.1038/nature09916%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/srep25982%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.144%5Cnhttp

Duman, M., Ay, H., Altun, S., Sahin, N., & Satıcıoğlu, I. B. (2021). *Flavobacterium muglaense* sp. Nov. isolated from the internal organs of apparently healthy rainbow trout. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(7). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004903>

Gómez-Rubio, V. (2017). ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition) . *Journal of Statistical Software*, 77(Book Review 2), 3–5. <https://doi.org/10.18637/jss.v077.b02>

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

Heckman, T. I., Yazdi, Z., Pomaranski, E. K., Sebastião, F. D. A., Mukkatira, K., Vuglar, B. M., Cain, K. D., Loch, T. P., & Soto, E. (2023). Atypical flavobacteria recovered from diseased fish in the Western United States. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(April), 1149032. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1149032>

Johnson, L. S., Eddy, S. R., & Portugaly, E. (2010). *Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure*. <http://ekhidna.biocenter>.

Keleher, J. G., Strobe, T. A., Estrada, N. E., Mathis, A. M. G., Eason, C. G., & Fiore, C. (2025). Freshwater sponges in the southeastern US harbor unique microbiomes that are influenced by host and environmental factors. *PeerJ*, 13, e18807. <https://doi.org/10.7717/peerj.18807>

Kharade, S. S., & McBride, M. J. (2015). *Flavobacterium johnsoniae* PorV is required for the secretion of a subset of proteins targeted to the type IX secretion system. *Journal of Bacteriology*, 197(1), 147–158. <https://doi.org/10.1128/JB.02085-14>

Kim, J., Cha, I. T., Lee, K. E., Son, Y. K., Yu, J., & Seol, D. (2023a). Genomic insights and comparative analysis of *Flavobacterium bizetiae* HJ-32-4 isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 116(10), 975–986. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01858-5>

Kim, J., Cha, I. T., Lee, K. E., Son, Y. K., Yu, J., & Seol, D. (2023b). Genomic insights and comparative analysis of *Flavobacterium bizetiae* HJ-32-4 isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 116(10), 975–986. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01858-5>



Kim, M., Cha, I., Lee, K., Li, M., Park, S., Kim, M., Cha, I., Lee, K., Li, M., & Park, S. (2023). *Metabolic versatility and evolution of the genus Flavobacterium*. 11(5).

Kim, Y. J., Kim, S. R., Nguyen, N. L., & Yang, D. C. (2013). *Flavobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 11), 4289–4293. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053819-0>

Kirchman, D. L. (2002). *The ecology of Cytophaga ^ Flavobacteria in aquatic environments*. 39.

Knupp, C., & Loch, T. P. (2023). *Immersion challenge of three salmonid species ( family Salmonidae ) with three multilocus sequence typing variants of Flavobacterium psychrophilum provides evidence of differential host specificity*. November, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfd.13889>

Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27(5), 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>

Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R., & Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), 2743–2751. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63650-0>

Lee, B. H., Nicolas, P., Saticioglu, I. B., Fradet, B., Bernardet, J. F., Rigauudeau, D., Rochat, T., & Duchaud, E. (2023). Investigation of the Genus *Flavobacterium* as a Reservoir for Fish-Pathogenic Bacterial Species: the Case of *Flavobacterium collinsii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(4). <https://doi.org/10.1128/aem.02162-22>

Lee, S., Nguyen, L. T., Hayes, B. J., & Ross, E. M. (2021). Prowler: a novel trimming algorithm for Oxford Nanopore sequence data. *Bioinformatics*, 37(21), 3936–3937. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab630>

Liu, H., Liu, R., Yang, S. Y., Gao, W. K., Zhang, C. X., Zhang, K. Y., & Lai, R. (2008). *Flavobacterium anhuiense* sp. nov., isolated from field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 756–760. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65536-0>

Liu, Q., Siddiqi, M. Z., Liu, Q., Huq, M. A., Lee, S. Y., Choi, K. D., & Im, W. T. (2018). *Flavobacterium hankyongi* sp. Nov., isolated from activated sludge. *International Journal*

of *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1732–1736.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002739>

Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>

Loch, T. P., & Faisal, M. (2014). *Flavobacterium spartansii* sp. nov., a pathogen of fishes, and emended descriptions of *Flavobacterium aquidurens* and *Flavobacterium araucanum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), 406–412. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.051433-0>

Loch, T. P., & Faisal, M. (2015). Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(3), 283–300. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.009>

Madetoja, J., Nystedt, S., & Wiklund, T. (2003). Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2), 217–223.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00396-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00396-3)

Matsui, M., Kawamata, A., Kosugi, M., Imura, S., & Kurosawa, N. (2017). Diversity of proteolytic microbes isolated from Antarctic freshwater lakes and characteristics of their cold-active proteases. *Polar Science*, 13, 82–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.polar.2017.02.002>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Musiał, K., Petruńko, L., & Gmiter, D. (2024). Simple approach to bacterial genomes comparison based on Average Nucleotide Identity (ANI) using fastANI and ANIclustermap. *Acta Universitatis Lodzianae. Folia Biologica et Oecologica*, 18, 66–71.  
<https://doi.org/10.18778/1730-2366.18.10>

Oren, A., Arahal, D. R., Rosselló-móra, R., Sutcliffe, I. C., & Moore, E. R. B. (2021a). *Preparing a revision of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes*. 1–6.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004598>

Oren, A., Arahal, D. R., Rosselló-móra, R., Sutcliffe, I. C., & Moore, E. R. B. (2021b). *Public discussion on a proposed revision of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes*. 4918. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004918>

- Otur, Ç., Okay, S., & Kurt-Kızıldoğan, A. (2023). Whole genome analysis of *Flavobacterium aziz-sancarii* sp. nov., isolated from Ardley Island (Antarctica), revealed a rich resistome and bioremediation potential. *Chemosphere*, 313(July 2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137511>
- Park, M., Joung, Y., Nam, G. G., Kim, S., & Cho, J. C. (2017). *Flavobacterium inkyongense* sp. nov., isolated from an artificial freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(1), 82–86. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001575>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Thunes, N. C., Conrad, R. A., Mohammed, H. H., Zhu, Y., Barbier, P., Evenhuis, J. P., Perez-Pascual, D., Ghigo, J. M., Lipscomb, R. S., Schneider, J. R., Li, N., Erbes, D. H., Birkett, C., LaFrentz, B. R., Welch, T. J., & McBride, M. J. (2022). Type IX Secretion System Effectors and Virulence of the Model *Flavobacterium columnare* Strain MS-FC-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/aem.01705-21>
- Thunes, N. C., Mohammed, H. H., Evenhuis, J. P., Stevick, R. J., Lipscomb, R. S., Pe, D., Birkett, C., Conrad, R. A., Ghigo, J., & McBride, M. J. (2023). Secreted peptidases contribute to virulence of fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Frontiers in Microbiology*, February, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1093393>
- Varani, A. M., Siguier, P., Gournayre, E., Charneau, V., & Chandler, M. (2011). ISSaga is an ensemble of web-based methods for high-throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. *Genome Biology*, 12(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-r30>

Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>

Waterhouse, R. M., Seppey, M., Simao, F. A., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2018). BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 35(3), 543–548. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx319>

Yukitake, H., Shoji, M., Sato, K., Handa, Y., Naito, M., Imada, K., & Nakayama, K. (2020). PorA, a conserved C-terminal domain-containing protein, impacts the PorXY-SigP signaling of the type IX secretion system. *Scientific Reports*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77987-y>

Zhang, D. F., He, W., Shao, Z., Ahmed, I., Zhang, Y., Li, W. J., & Zhao, Z. (2023). EasyCGTree: a pipeline for prokaryotic phylogenomic analysis based on core gene sets. *BMC bioinformatics*, 24(1), 390. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05527-2>